



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADOS EN INGENIERÍA QUÍMICA Y EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

**PRODUCCIÓN DE ACEITE RICO EN ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3 A PARTIR DE MICROALGAS
Y SUSTRATOS RESIDUALES**

AUTOR:
DÑA. BLANCA RUIZ ALONSO

SEPTIEMBRE, 2021



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADOS EN INGENIERÍA QUÍMICA Y EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

PRODUCCIÓN DE ACEITE RICO EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 A PARTIR DE MICROALGAS Y SUSTRATOS RESIDUALES

AUTOR:

DÑA. BLANCA RUIZ ALONSO

TUTOR:

D. MARTÍN RAMÍREZ MUÑOZ

D. JOSÉ JOAQUÍN GONZÁLEZ CORTÉS

DEPARTAMENTO INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

FIRMA DEL ALUMNO.

Titulación: GIQ+GBT

Título: Producción de aceite rico en ácido grasos omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales (nueva propuesta)

Curso: 2020/2021

Tutor1: martin.ramirez@uca.es (INGENIERIA QUIMICA Y TECN. DE ALIMENTOS)

Tutor2: joaquin.gonzalez@uca.es , (INGENIERIA QUIMICA Y TECN. DE ALIMENTOS)

Carácter: Revisión Bibliográfica + Proyecto de Ingeniería Química

Descripción:

Los beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-3 han atraído el interés de las industrias farmacéutica, nutracéutica, cosmética, alimentaria y de piensos dadas sus propiedades beneficiosas para la salud. Particularmente el DHA y EPA de cadena larga juegan un papel importante en el tratamiento de muchas enfermedades humanas como cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoide, alzheimer y psoriasis.

Tradicionalmente las principales fuentes de PUFA omega-3 son las especies de pescados grasos. Sin embargo, el aceite de algas está cobrando importancia debido a que su producción es respetuosa con el medio ambiente y se puede producir empleando sustratos de bajo costo como algunos subproductos agroalimentarios o efluentes industriales. En los últimos años se ha demostrado que algunas microalgas heterótrofas pueden mostrar un alto contenido de aceite (hasta 50-77% sobre una base de peso seco) compuesto principalmente de triacilglicerol ricos en DHA.

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado será llevar a cabo una revisión bibliográfica sistemática para seleccionar la especie o especies de microalgas más adecuadas, buscar subproductos para usarlos como sustrato del cultivo de microalgas, obtener datos cinéticos para el modelado y diseño del biorreactor e identificar las condiciones óptimas del proceso.

Alcance: el ámbito de aplicación del proyecto abarca el diseño y dimensionamiento del biorreactor de producción microalgas con alto porcentaje de aceites y del extractor de aceite. Se determinará qué especie o especies de microalgas son las más adecuadas, así como el tipo de sustrato. La producción anual será de 50 toneladas de PUFA por año con una concentración mínima de 5 g de PUFA por kg de biomasa seca. No se llevará a cabo el diseño de los equipos donde se producen las operaciones complementarias del proceso, tales como el secado de la biomasa, la ruptura de las algas o la concentración de ácidos grasos omega-3.

El proyecto se llevará a cabo respetando la legislación vigente a fecha de la propuesta en materia de construcción, seguridad, ambiental, etc. Se utilizará la siguiente normativa general de aplicación para este tipo de procesos, entre otras:

- Ley 34/2007, de 15 de noviembre, de calidad del aire y protección de la atmósfera.
- Decreto Legislativo 1/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de prevención y control integrados de la contaminación.
- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 2060/2008, de 12 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de equipos a presión y sus instrucciones técnicas complementarias.
- Real Decreto 815/2013, de 18 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación.

- Real Decreto 634/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba el Reglamento del Impuesto sobre Sociedades.

- Ley 27/2014, de 27 de noviembre, del Impuesto de Sociedades

Alumno propuesto: Blanca Ruiz Alonso blanca.ruiza@alum.uca.es

Curso: 2020/2021

Fecha: 06/11/2020 16:44:13

Es propuesta de alumno: NO; 0 Aceptada profesor: SÍ; Aceptada depto.: SÍ; Aceptada comisión: SÍ.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mí, por ser fiel a mí misma en cada momento
y luchar por lo que quiero.

A mi madre y mi padre por ser refugio en cada paso.

A Cádiz, por hacerme crecer y darme una familia:
mis niños, mis compis y mi Manué.

Índice

Documento I: Memoria	1
1. Resumen.....	2
2. Abstract.....	6
3. Objeto y Alcance	8
4. Definiciones y abreviaturas.....	10
4.1. Definiciones	10
4.2. Abreviaturas	11
5. Antecedentes	13
5.1. Microorganismos productores de aceites ricos en PUFAs omega-3.....	15
5.2. Producción industrial de aceite rico en PUFAs omega-3 a partir de microalgas heterótrofas.....	19
5.2.1. Condiciones operacionales	19
5.2.2. Fermentación	24
5.2.3. Procesamiento posterior	24
5.3. Mercado de EPA/DHA.....	26
6. Revisión bibliográfica.....	28
6.1. Introducción	28
6.2. Metodología	29
6.3. Desarrollo y discusión.....	30
6.3.1. Microalgas heterótrofas productoras de DHA.....	30
6.3.2. Producción industrial de aceite rico en PUFAs-omega 3 a partir de <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	33
6.4. Perspectivas de futuro	45
7. Conclusiones	47
8. Ubicación	48
9. Requisitos de diseño	49
10. Resultados de diseño.....	50
10.1. Cálculo de la productividad.....	50
10.2. Cálculo de las dimensiones características del biorreactor	50
10.3. Diseño mecánico del biorreactor	51
10.3.1. Selección del material del biorreactor	51
10.3.2. Cálculo del espesor mínimo de la carcasa	51
10.3.3. Diseño de los fondos	52
10.3.4. Diseño del agitador	54

10.3.5. Medidas del reactor	56
10.3.6. Peso del reactor.....	57
10.3.7. Soporte del reactor.....	57
10.4. Diseño del extractor de aceite	57
11. Planificación	61
12. Normas y referencias	63
Documento II: Anexos	68
Anexo I. Elección de la especie de microalga heterótrofa	69
A) <i>Cryptocodinium cohnii</i>	72
B) <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	74
C) Gráficos conjuntos.....	75
Anexo II. Modelo matemático. Cinética del proceso.....	77
A) Scripts para la configuración de 2 RCTA en serie	79
B) Scripts para la configuración de 2 RCTA en serie, alimentando el segundo con una corriente fuente de carbono.....	83
C) Scripts para la configuración de 1 RCTA.....	87
Anexo III. Condiciones de cultivo	91
Anexo IV. Cálculo de la productividad.....	94
Anexo V. Cálculo de las dimensiones características del biorreactor.....	95
Anexo VI. Diseño mecánico del biorreactor	97
A) Selección del material del biorreactor.....	97
B) Cálculo del espesor mínimo de la carcasa.....	97
C) Diseño de los fondos	103
D) Selección y diseño del agitador.....	106
E) Medidas reales del biorreactor.....	112
F) Peso del biorreactor	113
G) Soporte del biorreactor.....	114
H) Prueba hidráulica.....	115
Anexo VII. Diseño del extractor de aceite	116
Anexo VIII. Estudio de seguridad y salud en la obra	121
1. Objeto de estudio.....	121
2. Descripción y emplazamiento de la obra	121
3. Instalaciones provisionales y asistencia sanitaria.....	121
4. Maquinaria de obra.....	122
5. Medios auxiliares	123
6. Riesgos laborales evitables.....	123
7. Riesgos laborales no evitables.....	124
8. Riesgos laborales especiales.....	130

9. Medidas de prevención especiales para el coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19).....	130
10. Libro de incidencias	131
11. Paralización de los trabajos	132
12. Normativa de seguridad e higiene aplicada a la obra.....	132
Anexo IX. Estudio de seguridad en las unidades	134
1. Instrumentos de seguridad.....	134
2. Dispositivos de alivio de presión	134
3. Análisis de peligros y operabilidad (HAZOP)	134
Documento III: Planos.....	142
Documento IV: Pliego de condiciones.....	150
1. Condiciones generales	151
1.1. Objetivo del Pliego de Condiciones	153
1.2. Normativa general	153
1.3. Documentos del Proyecto	154
2. Condiciones de índole facultativa.....	156
2.1. Disposiciones generales	156
2.2. Términos del Pliego de Condiciones.....	156
2.3. Dirección facultativa	157
2.4. Obligaciones y derechos del contratista	158
2.5. Obra y ejecución.....	159
2.5.1. Facultades de la dirección de obra.....	159
2.5.2. Libro de Órdenes	160
2.5.3. Inicio del trabajo.....	160
2.5.4. Replanteo	160
2.5.5. Ejecución de la obra	161
2.5.6. Maquinaria.....	161
2.5.7. Materiales	161
2.5.8. Pruebas de control de calidad y ensayos	162
2.5.9. Puesta a punto y pruebas de funcionamiento	162
2.5.10. Almacenamiento de materiales.....	163
2.5.11. Partidas de alzada	163
2.5.12. Recepción provisional de las obras	163
2.5.13. Periodo de garantías.....	163
2.5.14. Condición final de la obra	164
2.5.15. Recepción definitiva de las obras	164
3. Condiciones económicas.....	165

3.1. Condiciones generales.....	165
3.2. Fianzas.....	165
3.3. Precios	166
3.4. Valoración, medición y abono de los trabajos	169
3.5. Indemnizaciones.....	170
3.6. Seguros y conservación de la obra	171
4. Condiciones legales	172
4.1. Disposiciones legales	172
4.2. Contratista	173
4.3. Leyes laborales.....	173
4.4. Mano de obra.....	174
4.5. Daños en propiedades vecinas.....	174
4.6. Rescisión del contrato	174
4.7. Adjudicación	175
4.8. Subcontratas	175
4.9. Accidentes de trabajo	175
5. Condiciones técnicas.....	176
5.1. Disposiciones de carácter particular.....	176
5.2. Materiales de construcción.....	176
5.3. Materiales para la fabricación de equipos	176
5.4. Equipos y maquinarias	181
5.5. Condiciones de ejecución.....	181
Documento V: Presupuesto.....	182
1. Introducción	183
2. Presupuesto de Ejecución Material (PEM).....	184
2.1. Coste del biorreactor	184
2.2. Coste del extractor sólido-líquido	187
3. Presupuesto Total de la Planta	187
4. Presupuesto de Ejecución material para Contrata (PEC).....	189
5. Presupuesto de Ejecución General (PEG)	189

Índice de Tablas

Tabla 1. Microorganismos oleaginosos productores de PUFAs.....	16
Tabla 2. Resultados obtenidos tras la simulación en Matlab 2016® de los tres modos de operación estudiados.....	34
Tabla 3. Parámetros cinéticos característicos del proceso.....	40
Tabla 4. Dimensiones características del biorreactor.	50
Tabla 5. Parámetros necesarios para el cálculo del espesor mínimo de carcasa.	52
Tabla 6. Dimensiones fondo tipo Kloppe.....	54
Tabla 7. Dimensiones del agitador tipo turbina Rushton de 6 palas.	55
Tabla 8. Medidas del biorreactor.	56
Tabla 9. Pesos del reactor.	57
Tabla 10. Balance de materia para 2 etapas ideales.....	59
Tabla 11. Definición de los hitos a alcanzar.....	61
Tabla 12. Parámetros cinéticos en batch de <i>C. cohnii</i> y <i>A. limacinum</i> para la producción de aceite rico en DHA.	71
Tabla 13. Parámetros cinéticos características del proceso.....	79
Tabla 14. Resultados obtenidos tras la simulación en Matlab 2016® de los tres modos de operación propuestos.	90
Tabla 15. Dimensiones características del biorreactor.	96
Tabla 16. Propiedades físicas del AI 316 (Callister, 2016).	97
Tabla 17. Denominaciones, composiciones, propiedades mecánicas y principales aplicaciones para aceros inoxidables (Callister, 2016).	100
Tabla 18. Ecuaciones para dimensionar el fondo Kloppe (Fondeyur, s.f.).	104
Tabla 19. Dimensiones fondo Kloppe.....	106
Tabla 20. Resumen dimensiones del agitador tipo turbina Rushton de 6 palas.	108
Tabla 21. Balance de materia para 2 etapas ideales.....	118
Tabla 22. Dimensiones del biorreactor en las unidades correctas.	185
Tabla 23. Parámetros característicos para calcular el coste del agitador.....	187
Tabla 24. Parámetros para estimar el coste total de la planta.	188
Tabla 25. Desglose del Coste Total de la Planta.	188
Tabla 26. Desglose del Presupuesto de Ejecución material para Contrato.	189
Tabla 27. Presupuesto de Ejecución General.	190

Índice de Figuras

Figura 1. (a) Molécula de DHA y (b) de EPA.....	14
Figura 2. Diagrama de bloques del proceso de producción de aceite rico en PUFAs omega-3 a partir de microalgas heterótrofas integrado es un enfoque de biorrefinería (adaptado de da Silva et al., 2019).	19
Figura 3. Evolución de la biomasa, el sustrato, el producto y la velocidad específica de crecimiento (μ) de <i>Cryptocodinium cohnii</i> y <i>Aurantiochytrium limacinum</i> operando en batch con las mismas condiciones iniciales.....	33
Figura 4. Esquema RMC.....	34
Figura 5. Diagrama del proceso con 2 RTA en serie (realizado con la herramienta EdrawMax®).	35
Figura 6. Representación gráfica del proceso en los 2 RTA dispuestos en serie.	35
Figura 7. Diagrama del proceso con 2 RTA en serie con el segundo alimentado con la fuente de carbono (realizado con la herramienta EdrawMax®).....	36
Figura 8. Representación gráfica del proceso en los dos RTA dispuestos en serie con el segundo alimentado.	36
Figura 9. Diagrama del proceso con 1 RTA (realizado con la herramienta EdrawMax®).	37
Figura 10. Representación gráfica del proceso en 1 RTA.....	37
Figura 11. Evolución de (a) la biomasa (<i>Aurantiochytrium limacinum</i>), (b) el sustrato carbonado, (c) el sustrato nitrogenado y (d) el producto en un reactor de tanque agitado operando en continuo.....	41
Figura 12. Factor de dilución óptimo.	43
Figura 13. Extractor horizontal tipo de Smet.	44
Figura 14. Imagen satélite de la ubicación propuesta para llevar a cabo el Proyecto. ...	48
Figura 15. Esquema del fondo toriesférico tipo Klopper.	53
Figura 16. Disposición de flujos en el proceso de extracción.	57
Figura 17. Diagrama de Gantt del Proyecto.	62
Figura 18. Evolución de la biomasa, el sustrato, el producto y la velocidad específica de crecimiento (μ) de <i>Cryptocodinium cohnii</i> y <i>Aurantiochytrium limacinum</i> operando en batch con las mismas condiciones iniciales.....	76
Figura 19. Representación gráfica del proceso en los dos RTA dispuestos en serie.....	83
Figura 20. Representación gráfica del proceso en los dos RTA dispuestos en serie con	

el segundo alimentado.	87
Figura 21. Representación gráfica del proceso en 1 RTA.....	89
Figura 22. Productividad de biomasa.	91
Figura 23. Productividad de DHA.....	91
Figura 24. Productividad de biomasa frente a concentración de glucosa en la entrada.	92
Figura 25. Productividad de DHA frente a concentración de glucosa en la entrada.	92
Figura 26. Productividad de biomasa frente a concentración de nitrógeno en la entrada.	93
Figura 27. Productividad de DHA frente a concentración de nitrógeno en la entrada..	93
Figura 28. Esquema del fondo toriesférico tipo Klopper.	104
Figura 29. Gráfico para elegir tipo de agitador en función de la viscosidad del medio.	107
Figura 30. Relaciones dimensionales impulsor tipo turbina Rushton de 6 palas (Belda Ferrin, 2013).	107
Figura 31. Gráfico que relaciona el número de Reynolds (N_{Re}) con el número de potencia (N_P) para turbina de 6 palas (Castillo, 2013).	110
Figura 32. Disposición de flujos en el proceso de extracción.	117
Figura 33. Gráfica para calcular costo base por el método de Guthrie.	185
Figura 34. Ecuación y factores de corrección para calcular el coste del biorreactor según el método de Guthrie.	185

Documento I: Memoria

Índice

1. Resumen.....	2
2. Abstract.....	6
3. Objeto y Alcance	8
4. Definiciones y abreviaturas.....	10
4.1. Definiciones	10
4.2. Abreviaturas	11
5. Antecedentes	13
5.1. Microorganismos productores de aceites ricos en PUFAs omega-3.....	15
5.2. Producción industrial de aceite rico en PUFAs omega-3 a partir de microalgas heterótrofas.....	19
5.2.1. Condiciones operacionales	19
5.2.2. Fermentación	24
5.2.3. Procesamiento posterior	24
5.3. Mercado de EPA/DHA.....	26
6. Revisión bibliográfica.....	28
6.1. Introducción	28
6.2. Metodología	29
6.3. Desarrollo y discusión.....	30
6.3.1. Microalgas heterótrofas productoras de DHA.....	30
6.3.2. Producción industrial de aceite rico en PUFAs-omega 3 a partir de <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	33
6.4. Perspectivas de futuro	45
7. Conclusiones	47
8. Ubicación	48
9. Requisitos de diseño	49
10. Resultados de diseño.....	50
10.1. Cálculo de la productividad.....	50
10.2. Cálculo de las dimensiones características del biorreactor	50
10.3. Diseño mecánico del biorreactor	51
10.3.1. Selección del material del biorreactor	51
10.3.2. Cálculo del espesor mínimo de la carcasa	51
10.3.3. Diseño de los fondos	52
10.3.4. Diseño del agitador	54
10.3.5. Medidas del reactor	56

10.3.6. Peso del reactor.....	57
10.3.7. Soporte del reactor.....	57
10.4. Diseño del extractor de aceite	57
11. Planificación	61
12. Normas y referencias	63

1. Resumen

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3 son esenciales para mantener las funciones biológicas en los seres humanos, reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular y tienen un papel crucial en el sistema nervioso, pero deben ingerirse con la alimentación, ya que, los humanos no pueden sintetizarlos.

Entre los PUFAs más interesantes destacan el ácido docosahexaenoico (DHA), importante en personas de edades tempranas y a partir de los 55-60 años debido a que facilita la función normal del cerebro y ojos, y el ácido eicosapentaenoico (EPA), importante para personas adultas, ya que protege el sistema cardiovascular y aumenta la resistencia al estrés.

La mayor parte del aceite rico en PUFAs omega-3, en términos de valor, se usa en suplementos dietéticos (43%), industria farmacéutica (23%) y preparados para lactantes o fórmulas infantiles (14%). En estos sectores es más usado el aceite rico en DHA, por lo que este trabajo se centrará en la producción del mismo.

Para la producción de DHA, en el presente trabajo, se propone el cultivo heterótrofo de la microalga *Aurantiochytrium limacinum* en un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) empleando glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura y peptona como fuentes de nitrógeno. Trabajando con parámetros cinéticos encontrados en la bibliografía (tasa de crecimiento de $0,18 \text{ h}^{-1}$) y manteniendo una agitación de 150 rpm y una aireación de 1 vvm, se ha logrado una productividad respecto a la biomasa de $18,92 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y respecto a DHA de $2,84 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ tras una fermentación en una etapa.

Para obtener un aceite con alta concentración de DHA, se propone realizar una extracción con hexano al caldo obtenido del biorreactor. Tras el diseño del extractor, se ha determinado que con 2 etapas el rendimiento del aceite es superior a 95%, y se obtiene una producción anual de 79,8 Tn de DHA con una concentración de 0,14 kg de DHA por kg de biomasa.

Tras la extracción, la mezcla de hexano y DHA se separa por destilación; el hexano se recirculará al sistema de extracción, mientras que el aceite crudo rico en DHA se

almacenará para su posterior venta a industrias de refino.

Para integrar el proceso en el concepto de biorrefinería, la biomasa desaceitada puede venderse a otros sectores industriales, ya que puede utilizarse como alimento, fertilizante y sustrato para la producción de bioetanol/biometano.

2. Abstract

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are essential to maintain biological functions in humans, reduce the risk of cardiovascular disease and play a crucial role in the nervous system, but they must be ingested with the diet, since humans cannot synthesize them.

Among the PUFAs most interesting include the docosahexaenoic acid (DHA), important in early ages and from 55-60 years because it facilitates the normal brain and eyes function, and the eicosapentaenoic acid (EPA) important for adults, as it protects the cardiovascular system and increases resistance to stress.

Most of the oil rich in omega-3 PUFAs, in terms of value, is used in dietary supplements (43%), pharmaceutical industry (23%) and infants or infant formulas (14%). In these sectors, oil rich in DHA is more used, so this work will focus on its production.

For the production of DHA, in the present paper, the heterotrophic culture of the microalgae *Aurantiochytrium limacinum* is proposed in a continuous stirred tank reactor (RCTA) using glucose as a carbon source and yeast extract and peptone as nitrogen sources. Working with kinetic parameters found in the bibliography (growth rate of $0,18 \text{ h}^{-1}$) and maintaining a stirring of 150 rpm and aeration of 1 vvm, a productivity with respect to biomass of $18,92 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ has been achieved and with respect to DHA of $2,84 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ after fermentation in one stage.

To obtain an oil with a high concentration of DHA, it is proposed to carry out an extraction with hexane to the broth obtained from the bioreactor. After the design of the extractor, it has been determined that with 2 stages the oil yield is greater than 95%, and an annual production of 79,8 Tn of DHA is obtained with a concentration of 0,14 kg of DHA per kg of biomass.

After extraction, the mixture of hexane and DHA is distilled off; the hexane will be recirculated to the extraction system, while the crude oil rich in DHA will be stored for later sale to refining industries.

To integrate the process into the biorefinery concept, the deoiled biomass can be sold to other industrial sectors, since it can be used as food, fertilizer and substrate for the production of bioethanol/biomethane.

3. Objeto y Alcance

El presente Trabajo Fin de Grado, correspondiente a los grados en Ingeniería Química y en Biotecnología, tiene como objetivos principales llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre el proceso de producción de aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales, así como diseñar y dimensionar un biorreactor para dicho proceso.

Las propiedades beneficiosas de los PUFAs omega-3 para la salud humana han atraído el interés de las industrias farmacéutica, nutracéutica, cosmética, alimentaria y de piensos. Destacan el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) por su importante papel en el tratamiento de muchas enfermedades humanas como cáncer, artritis reumatoide, aterosclerosis, alzhéimer y psoriasis.

De esta manera, el presente proyecto tiene en cuenta áreas relacionadas con la salud humana y con la preservación de los ecosistemas marinos, ya que tradicionalmente las principales fuentes de PUFAs omega-3 son las especies de pescados grasos.

Para alcanzar dicha meta es necesario conseguir los siguientes objetivos secundarios:

- Encontrar una alternativa viable a los procesos tradicionales de obtención de PUFAs omega -3.
- Seleccionar la especie de microalga más adecuada.
- Buscar subproductos para usarlos como sustrato del cultivo de microalgas.
- Obtener datos cinéticos para el modelado y diseño del biorreactor.
- Identificar las condiciones óptimas del proceso.
- Diseñar un biorreactor para la producción de aceite rico en ácidos grasos omega-3 para obtener una productividad de 50 toneladas de PUFAs por año con una concentración mínima de 5 g de PUFAs por kg de biomasa seca.

- Diseñar y dimensionar el extractor de aceite.

La productividad anual mencionada anteriormente y los datos cinéticos obtenidos de la bibliografía constituyen el punto de partida del diseño del proceso de producción, el cual se enfocará como un proceso integrado basado en el uso de una biorrefinería de microalgas que utilice eficientemente todos los productos que se puedan obtener de las mismas, a fin de lograr un proceso sostenible.

El proceso consta de operaciones complementarias: filtración y secado de la biomasa microalgal, ruptura de las microalgas y purificación de compuestos omega-3; cuyos equipos ni se diseñarán ni se dimensionarán.

De la misma manera tampoco se dimensionarán las tuberías, ni se llevará a cabo la selección de equipos auxiliares tales como las bombas, el sistema de esterilización o los sistemas de control.

4. Definiciones y abreviaturas

4.1. Definiciones

Ácido graso: biomolécula de naturaleza lipídica compuesta fundamentalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno. Tienen una larga cadena hidrocarbonada con un número par de carbonos y en un extremo hay un grupo carboxilo (-COOH).

Microalga: organismos microscópicos (normalmente de 2 a 20 μm de tamaño) eucariotas fotoautótrofos en su mayoría, aunque según la especie puede desarrollarse de manera fotoheterótrofa, mixotrófica o heterótrofa. Se desarrollan tanto en ambientes marinos como en agua dulce y, en general, son altamente eficientes en la fijación de CO_2 y utilización de la energía solar para producir biomasa.

Condicionalmente esencial: compuesto producido usualmente en cantidades adecuadas por síntesis endógena, pero en determinadas condiciones se requiere de forma exógena.

Organismo autótrofo: organismo capaz de sintetizar todas las sustancias que necesita para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas por medio de la fotosíntesis.

Organismo heterótrofo: organismo incapaz de sintetizar su propio alimento. No puede fijar carbono y utiliza compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos para su crecimiento. Si usa luz para obtener energía, entonces se considera un fotoheterótrofo, mientras que si usa energía química se considera un quimioheterótrofo.

Condiciones axénicas: cultivo de una sola especie microbiana, proveniente de una sola célula. Son muy extraños en la naturaleza, normalmente se obtienen artificialmente en un laboratorio.

Neurogénesis: proceso por el cual se generan nuevas neuronas en el cerebro, se encuentra más activo durante el desarrollo prenatal, pero continúa en ciertas regiones del cerebro después del nacimiento y durante toda nuestra vida.

Condiciones kosher o halal: el término kosher define al conjunto de alimentos preparados de acuerdo a las normas dietéticas judías; y los alimentos halal son aquellos

permitidos o autorizados para la comunidad musulmana.

Glucólisis: ruta metabólica en la que una molécula de glucosa se transforma en dos moléculas de piruvato, a la vez que se produce energía en forma de ATP y de NADH. Es una ruta presente en todos los organismos y células.

Ruta de la pentosa fosfato: ruta metabólica en la que se utiliza glucosa para generar ribosa necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, también se produce energía en forma de NADH.

Solvente apolar-aprótico: sustancias químicas de tipo orgánico que carecen de polo positivo y negativo en sus moléculas, además no tienen ningún átomo de hidrógeno disociable. Son capaces de disolver sustancias no hidrosolubles.

4.2. Abreviaturas

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

ALA: Ácido alfa linolénico; 18:3 ω 3

GLA: Ácido gamma linolénico; 18:3 ω 6

EPA: Ácido eicosapentaenoico; 20:5 ω 3

DPA: Ácido docosapentaenoico; 22:5 ω 3

DHA: Ácido docosahexaenoico; 22:6 ω 3

ARA: Ácido araquidónico; 20:6 ω 6

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

OMS: Organización Mundial de la Salud

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

SCO: Aceites de origen microbiano

TG: Triglicéridos

TAG: Triacilglicéridos

SSF: Fermentación en estado sólido

DO: Oxígeno disuelto

PCB: Policlorobifenilos

PBR: Fotobiorreactor

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos

FC: Citometría de flujo

RMC: Reactor de mezcla completa

RCTA: Reactor continuo de tanque agitado

RTA: Reactor de tanque agitado

AMP: Adenosín monofosfato

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

IMP: Inosina monofosfato

5. Antecedentes

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son ácidos grasos con más de un doble enlace entre sus carbonos, según el lugar donde se localiza el primer doble enlace respecto al carbono unido al grupo metilo ($-\text{CH}_3$), se distinguen dos series: omega-3 y omega-6.

El ácido linolénico es el precursor de ambos tipos, el isómero alfa de los omega-3 y el isómero gamma de los omega-6. El ácido gamma linolénico (GLA) es condicionalmente esencial, mientras que el ácido alfa linolénico (ALA) se considera esencial, debido a que su tasa de conversión en ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) es baja, por tanto, es necesaria la ingesta de PUFAs omega-3 a través de la dieta (Ochsenreither et al., 2016; Salem Jr & Eggersdorfer, 2015). Normalmente se recomienda una ingesta de 0,5 g/día de DHA para lactantes y un promedio de 1 g/día para adultos (Ward & Singh, 2005).

El interés por los PUFAs se remonta a 1975 cuando la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendaron la similitud entre la fórmula de leche infantil y la leche materna, la cual es rica en ARA y DHA (da Silva et al., 2006; Ward & Singh, 2005).

Los ácidos grasos omega-3 reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular gracias a distintos mecanismos como la reducción de arritmia ventricular, el fomento de la relajación endotelial o por sus propiedades antiinflamatorias. Además, tienen un papel crucial en el sistema nervioso, desempeñan funciones como la neurogénesis, la neurotransmisión y la protección contra el daño cerebral inducido por estrés oxidativo (Adarme-Vega et al., 2012; Cuellar-Bermudez et al., 2015; da Silva et al., 2019; Vonshak, 1990; Ward & Singh, 2005).

Se ha demostrado que el DHA (Figura 1 **Figura I** **Figura I** **Figura I**) es importante para el desarrollo adecuado del cerebro y los ojos en los bebés, ya que es un componente importante de la materia gris del cerebro y la retina del ojo (Adarme-Vega et al., 2012; Ganuza et al., 2008; Ochsenreither et al., 2016). Sin embargo, el EPA (Figura 1) está contraindicado en las dietas infantiles ya que compite con el DHA a la hora de incorporarse a los lípidos de la retina y tejidos neuronales, así que tanto la

Administración de Alimentos y Medicamento de los Estados Unidos (FDA) como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aconsejan no utilizar aceites que contengan EPA en fórmulas infantiles (da Silva et al., 2006; Liu et al., 2020; Valdivieso, 2012; Ward & Singh, 2005).

El EPA se utiliza para el tratamiento de aterosclerosis, esquizofrenia y algunos tipos de cánceres, aunque existe incertidumbre sobre la posibilidad de que pueda contribuir al adelgazamiento de las paredes arteriales en ciertas personas produciendo sangrados (Ward & Singh, 2005).

En recién nacidos, personas de edades tempranas y personas a partir de los 55-60 años, el DHA es más importante que el EPA, porque facilita la función normal de nuestro cerebro y ojos. Sin embargo, para personas adultas, el EPA es más importante que el DHA, ya que protege más efectivamente el sistema cardiovascular y aumenta la resistencia al estrés.

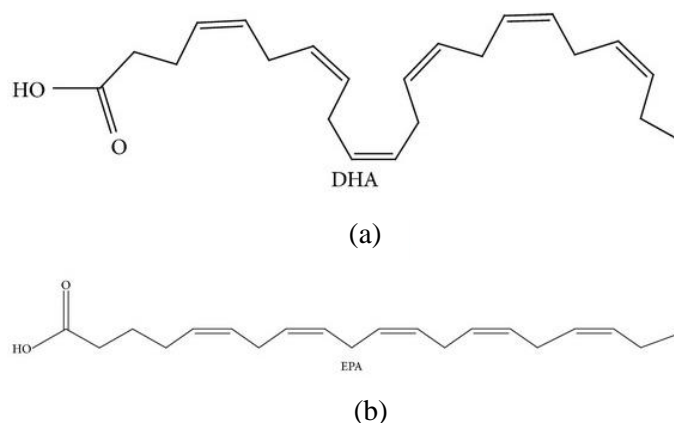


Figura 1. (a) Molécula de DHA y (b) de EPA.

Tradicionalmente las principales fuentes de PUFAs omega-3, incluyendo DHA y EPA, son peces grasos como el arenque, la caballa, la sardina y el salmón; sin embargo, las poblaciones mundiales de peces están menguando, por tanto, no son una fuente sostenible. Además, la calidad del aceite de pescado depende de varios factores tales como las especies de peces, el momento y el lugar de la captura, y la posibilidad de presentar contaminantes (PCB y metales pesados) que impiden su uso en la industria alimentaria, farmacéutica o nutracéutica (Adarme-Vega et al., 2012; Liu et al., 2020; van der Voort et al., 2017; Wu et al., 2005).

Por otra parte, vegetales como el maíz, la soja, el girasol, la calabaza o las nueces son posibles alternativas, pero su producción depende de las condiciones estacionales y climáticas, así como de la disponibilidad de tierras de cultivo (da Silva et al., 2019; Rumiani et al., 2018).

De esta manera, se llega a la producción de aceites microbianos (SCO, por sus siglas en inglés: *single cell oil*) los cuales son lípidos de almacenamiento intracelular. Todos los microorganismos sintetizan una cantidad de lípidos para sus membranas y funciones vitales y estructurales, pero existe un conjunto de microorganismos conocidos como oleaginosos que son capaces de acumular aceite en una cantidad superior al 20% de su masa celular como material de reserva, algunos incluso pueden llegar al 80%. Los organismos oleaginosos se encuentran entre las bacterias, los protozoos, las levaduras, los hongos filamentosos y las microalgas (Ochsenreither et al., 2016).

Estos microorganismos son una fuente alternativa viable de PUFAs, ya que pueden emplear sustratos baratos y producir productos comercializables de alto valor añadido, lo que conlleva una reducción de coste en el proceso de producción. Además, existe la posibilidad de buscar cepas más eficientes y disponer de técnicas genéticas para su mejora (da Silva et al., 2019; Ochsenreither et al., 2016; Valdivieso, 2012; Vonshak, 1990; Ward & Singh, 2005).

5.1. Microorganismos productores de aceites ricos en PUFAs omega-3

Las características generales requeridas por los microorganismos productores de productos industriales son (Bumbak et al., 2011; Vonshak, 1990):

- Estabilidad genética, de manera que los microorganismos no pierdan las características deseables o asuman características indeseables relacionadas con el proceso o el producto. Esta estabilidad es importante ya que agencias como la FDA requieren que el organismo, y por lo tanto el proceso, no se desvíe significativamente del proceso que recibió la aprobación.
- Las cepas deben ser no patógenas y no formadoras de toxinas, de modo que sea seguro trabajar con ellas para los empleados en la planta de producción y que el

producto sea seguro para su incorporación en piensos, alimentos, suplementos dietéticos y productos farmacéuticos.

- El organismo debe ser capaz de utilizar medios de fermentación de bajo costo, y en el caso de las fermentaciones aeróbicas, de resistir el cizallamiento debido a la agitación y la aireación.
- Cuando el producto es un metabolito intermediario, la cepa no debe metabolizar ni transformar más el producto deseado.

Focalizando en los microorganismos industriales productores de PUFAs omega-3, estos deben tener capacidad de crecimiento y formación de producto a bajas salinidades y temperaturas más altas (~ 30 °C), producir una alta proporción de lípidos deseados (en forma de TG si se destinan al consumo humano), y preferiblemente baja de los no deseados, y la extracción del aceite de la biomasa debe ser fácil (Ward & Singh, 2005).

A continuación, en la Tabla 1 **Tabla 1** se muestra un resumen de microorganismos oleaginosos que producen PUFAs.

Tabla 1. Microorganismos oleaginosos productores de PUFAs

Tipo de microorganismo	Microorganismos
Bacterias	<i>Photobacterium profundum</i> cepa ss9, <i>Shewanella</i> cepa SCRC-2738 y <i>Moritella marina</i> cepa MP-1
Hongos filamentosos	<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Mortierella isabelina</i> , y <i>Mortierella alpina</i>
Microalgas fotoautótrofas	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> y <i>Monodus subterraneus</i>
Microalgas heterótrofas	Familias Thraustochytriacea (<i>Aurantiochytrium</i> , <i>Traustochytrium</i> , <i>Schizochytrium</i> , <i>Ulkenia</i>) y Crythecodiniacea (<i>Crythecodinium</i>); <i>Nitzschia laeve</i> ; <i>Chlorella sp.</i> y <i>Tetraselmis sp.</i>

Originalmente, se consideraba que las membranas bacterianas carecían de PUFAs; en cambio, se ha demostrado que muchas especies bacterianas de origen marino, en particular las que se encuentran en aguas profundas a alta presión y baja temperatura, producen PUFAs, sobre todo EPA y DHA. A pesar de tener esta capacidad de producir lípidos en cantidad, las bacterias no suscitan interés como cepas comerciales para este propósito debido a sus condiciones de crecimiento, a la difícil extracción de los lípidos y a que algunas están consideradas como agentes alérgicos y tóxicos (Valdivieso, 2012; Ward & Singh, 2005).

Especies de hongos del género *Mortierella* acumulan un alto porcentaje de ARA en la fracción lipídica, *Mortierella alpina* se considera el productor industrial más eficaz de ARA, ya que puede producir hasta el 60% del total de ácidos grasos como ARA; sin embargo, las bajas temperaturas favorecen la producción de GLA y EPA, a pesar de ser una desventaja desde la perspectiva de la tasa de crecimiento. Otras especies como *Mucor circinelloides* y *Mortierella isabelina* se emplean para la producción de GLA (Ganuza et al., 2008; Ochsenreither et al., 2016; Valdivieso, 2012; Ward & Singh, 2005). No obstante, en este trabajo el objetivo es producir un aceite rico en PUFAs omega-3, no omega-6, por lo que no sería viable trabajar con hongos filamentosos.

Varios grupos de microalgas, incluidas diatomeas, crisófitas o dinoflageladas, producen PUFAs de cadena larga. En la actualidad, el aceite de algas representa menos del 2% del consumo humano de EPA/DHA, pero su contribución ha ido en aumento debido a su inocuidad para el medio ambiente, su buen sabor, la ausencia de colesterol y contaminantes, su carácter vegetariano, así como la posibilidad de ser fabricado en condiciones kosher o halal. Además, las microalgas pueden crecer con sustratos de bajo costo, como subproductos o efluentes industriales que contienen carbono, produciendo simultáneamente PUFAs y otros lípidos que pueden convertirse en bioenergía, para la producción combinada de calor y energía (CHP), o biocombustibles líquidos, para ser integrados en el sistema de transporte (da Silva et al., 2019)

Entre las microalgas fotoautótrofas destacan *Phaeodactylum tricornutum* y *Monodus subterraneus* como buenas fuentes de EPA. Dentro de las microalgas heterótrofas, géneros como *Aurantiochytrium*, *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia* y *Cryptothecodinium* son fuentes ricas en DHA. En concreto, los géneros *Schizochytrium*

(*Esquizoquitrios*) y *Crypthecodinium* presentan altos rendimientos de DHA dando como resultado una producción de aceite de bajo costo utilizado como suplemento dietético para adultos en los mercados de alimentos y bebidas, en alimentos para animales y en maricultura. Además, en acuicultura se incluyen las especies *Chlorella*, *Nitzschia*, *Cyclotella* y *Tetraselmis* (Adarme-Vega et al., 2012; Cuellar-Bermudez et al., 2015; da Silva et al., 2006, 2019; Diao et al., 2018; Ganuza et al., 2008; Guo et al., 2018; Liu et al., 2020; Rumiani et al., 2018; Ward & Singh, 2005).

Los cultivos de microalgas fotoautótrofas mitigan las emisiones de gases de efecto invernadero debido a su consumo de CO₂ y a la producción de O₂, y pueden utilizar agua no potable y tierras no cultivables, lo que constituye una ventaja sobre los cultivos heterótrofos. Sin embargo, muestran varias limitaciones: se requiere un suministro continuo y limpio de agua; podría producirse una escasa difusión de la luz en el cultivo dando lugar a bajas productividades de biomasa; fácil contaminación por otros organismos; dependencia de las condiciones estacionales y climáticas y dificultad en la recolección de biomasa de microalgas debido a las bajas concentraciones de biomasa. Para superar estas limitaciones, pueden utilizarse fotobiorreactores (PBR) que permiten desarrollar cultivos de microalgas fotoautótrofas en condiciones controladas, pero la inversión inicial es elevada, requieren un mantenimiento continuo y cuando se utilizan grandes volúmenes de cultivo es difícil mantener una dispersión eficiente de la luz a través del cultivo, lo que se agrava si se desarrollan biopelículas en las superficies (Hu et al., 2018; Perez-Garcia et al., 2011; Vonshak, 1990; Ward & Singh, 2005).

Los cultivos de microalgas heterótrofas se realizan en fermentadores convencionales, en condiciones estrictamente axénicas y operativas, siendo menos propensos a la contaminación microbiana que los cultivos autótrofos cuando se realizan al aire libre. Por consiguiente, las condiciones heterótrofas pueden aumentar la concentración de biomasa microalgal en comparación con las condiciones fototróficas, lo que da lugar a una mayor productividad de biomasa y lípidos. Además, en la mayoría de los casos, los sistemas de cultivo heterótrofos son más baratos, más fáciles de mantener a gran escala, y las instalaciones son más sencillas de construir.

Los cultivos autótrofos de microalgas en PBR situados a latitudes altas requieren sistemas de calefacción e infraestructuras costosas para mantener alta la productividad,

por lo que se estima una disminución del rendimiento del proceso autótrofo de un 33% al pasar a 40° N desde el ecuador, así que en los países europeos es recomendable el cultivo de microalgas heterótrofas (da Silva et al., 2019; Patel et al., 2018; Perez-Garcia et al., 2011; Ward & Singh, 2005).

Por tanto, en el presente trabajo se realizará un estudio para encontrar una especie de microalga heterótrofa que muestre alta productividad de PUFAs omega-3.

5.2. Producción industrial de aceite rico en PUFAs omega-3 a partir de microalgas heterótrofas

El rendimiento y la composición de los lípidos microalgales obtenidos dependen del tipo de fermentación, la especie de microalga elegida y las condiciones operacionales. En general, el coste del procesamiento posterior es uno de los principales obstáculos que deben resolverse para lograr la eficiencia económica total del proceso.

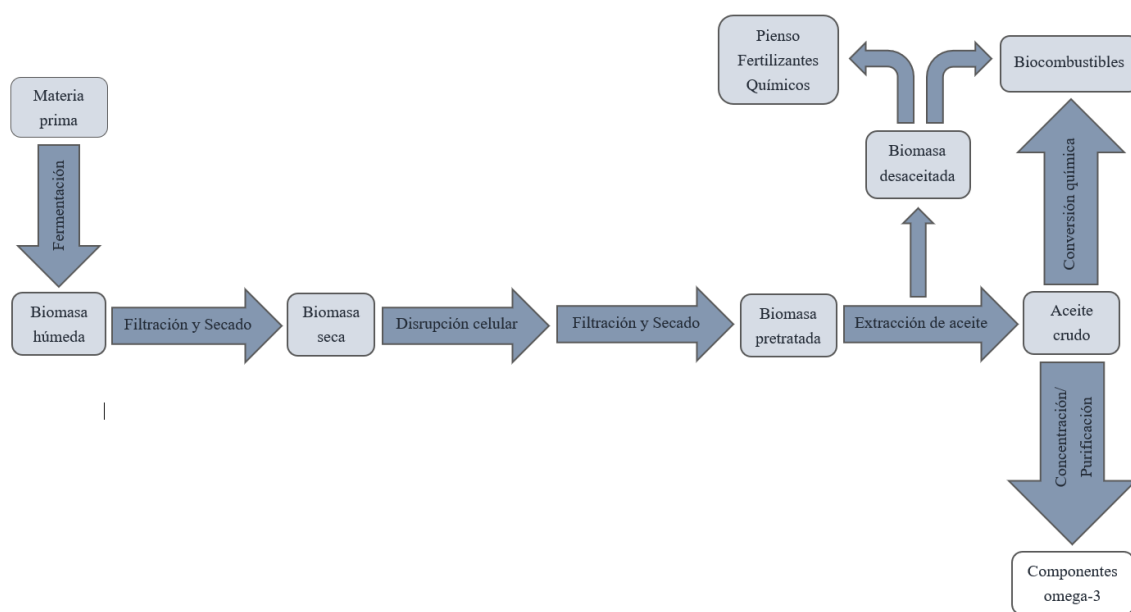


Figura 2. Diagrama de bloques del proceso de producción de aceite rico en PUFAs omega-3 a partir de microalgas heterótrofas integrado es un enfoque de biorrefinería (adaptado de da Silva et al., 2019).

5.2.1. Condiciones operacionales

Composición del medio de cultivo

La fuente de carbono es el componente más caro del medio de fermentación. Los sustratos típicos para el cultivo de microalgas heterótrofas cuya finalidad es producir

aceites ricos en compuestos omega-3 son la glucosa, el etanol, el acetato y el glicerol porque inducen altas productividades de lípidos y DHA, pero son costosos, además el etanol y el ácido acético son peligrosos y difíciles de manipular y transportar (de Swaaf et al., 1999; Hu et al., 2018; Mendes, Guerra, et al., 2007; Vonshak, 1990).

Otros componentes costosos del medio de cultivo son los compuestos nitrogenados. Se pueden utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno (amonio, amoníaco, nitrato, urea), pero carecen de los oligoelementos y otros nutrientes (e.g. vitaminas) que son esenciales para el crecimiento de microalgas y están presentes en fuentes complejas de nitrógeno como las proteínas degradadas (extracto de levadura y peptonas de soja).

La relación carbono:nitrógeno influye en la acumulación de lípidos, generalmente se emplea un ratio 5:1 (Bumbak et al., 2011; Safdar, Shamooun, et al., 2017; Safdar, Zan, et al., 2017; Vonshak, 1990).

La creciente conciencia pública de la necesidad de lograr una economía circular, así como la necesidad de utilizar sustratos de bajo costo como materia prima para reducir los costos de los bioprocesos, han dado lugar a la búsqueda de desechos, subproductos y efluentes para utilizarlos como nutrientes en las formulaciones de los medios para el crecimiento microbiano. De hecho, en los últimos años, los sustratos como desechos alimenticios hidrolizados, sorgo dulce, jarabe de pulpa de algarrobo, jarabe de pulpa de dátiles, hidrolizado de harina de colza mezclado con melaza cruda, suero de queso mezclado con licor de maíz, caldo de patata hidrolizado o licor de maíz se han utilizado para la producción de compuestos omega-3 a partir de microalgas heterótrofas.

Sin embargo, estos sustratos complejos requieren etapas de pretratamiento para poder ser asimilados por la mayoría de microorganismos, y esto conlleva un encarecimiento del proceso (da Silva et al., 2019; Gong et al., 2015; Mendes, Guerra, et al., 2007; Rumiani et al., 2018).

Modo de operación

La fermentación del aceite de algas se lleva a cabo preferentemente en dos etapas: una primera fase de crecimiento activo, donde todos los nutrientes están en exceso y permite la proliferación celular, consumiendo la fuente de carbono y nitrógeno; y una segunda

fase, donde falta un nutriente, a menudo el nitrógeno, en la que se promueve la producción y acumulación de lípidos ricos en DHA, reduciéndose la producción de biomasa (da Silva et al., 2006; Ochsenreither et al., 2016). El proceso se puede llevar a cabo en régimen continuo, discontinuo alimentado (*fed-batch*) y discontinuo (*batch*), independientemente de que se emplee una o dos fases. El proceso continuo presenta una mayor simplicidad en el procesado, así como mayor facilidad en el escalado de factores como la aireación y la agitación (Pellicer et al., 2018).

Las condiciones de estrés que inducen la síntesis microbiana de lípidos suelen producir bajas concentraciones de biomasa microalgal y pueden promover el daño oxidativo de los PUFAs haciéndolos inadecuados para aplicaciones comerciales. Por este motivo se han adoptado otras estrategias para mejorar la resistencia antioxidante de las microalgas: bajas temperaturas y altas salinidades (Sun et al., 2018).

Oxígeno disuelto (DO)

El requerimiento de oxígeno depende de la especie de microalgas. Tiene un papel clave en la fase inicial de la producción de biomasa, ya que deben evitarse daños celulares, y en la producción de lípidos microalgales promueve la formación de dobles enlaces en los ácidos grasos omega-3 finales.

Para garantizar un aporte suficiente de oxígeno en los cultivos de microalgas deben utilizarse tasas de agitación y/o aireación adecuadas, pero con cuidado, ya que algunas especies, en particular los dinoflagelados, son sensibles al estrés de cizallamiento (da Silva & Reis, 2015; Diao et al., 2018; Hillig et al., 2014; Wang & Lan, 2018).

pH

El pH del medio de cultivo afecta a la biomasa microalgal y a la producción de DHA. El pH óptimo para la producción de biomasa y lípidos depende de la cepa de microalgas, y debe intentar mantenerse durante todo el proceso, de lo contrario el organismo gasta energía tratando de restaurar el pH óptimo que no se utilizará para el crecimiento y la producción de lípidos (da Silva et al., 2019).

Temperatura

La temperatura es un factor clave para el crecimiento de las algas, también puede influir en el consumo de energía del proceso global. Independientemente del género de microalgas, la temperatura óptima para el crecimiento de las microalgas no coincide con la temperatura óptima para la producción de DHA.

Las temperaturas más altas aumentan el crecimiento celular, mientras que las más bajas aumentan la producción de ácidos grasos insaturados, ya que la fluidez de la membrana celular disminuye y, para compensarlo y mantener la estructura y las propiedades de la membrana celular, las células responden promoviendo la sobreexpresión de los genes de las desaturasas, lo que resulta en la desaturación de los lípidos de la membrana, aumentando la producción de ácidos grasos insaturados que ayudan a mantener la fluidez de la membrana (Perez-Garcia et al., 2011; Safdar, Zhan, et al., 2017).

Salinidad

La mayoría de las microalgas heterótrofas productoras de PUFAs omega-3 son microorganismos marinos, así que necesitan un medio de cultivo salino para crecer, pero el nivel de sal óptimo varía ampliamente entre las diferentes especies. Hay que tener en cuenta que la salinidad es perjudicial para los fermentadores de acero utilizados a gran escala, corroe las paredes. El desarrollo de un medio con bajo contenido de cloruro puede superar este problema, pero una patente protege el uso del mismo, lo que limita su uso (Behrens & Kyle, 1996; Bumbak et al., 2011).

Actualmente, el acero inoxidable de grado estándar 304 es el que se utiliza en la fabricación de biorreactores y puede soportar 0,3-0,5 g de NaCl/L; en cambio, los biorreactores construidos con acero inoxidable de grado estándar 316 pueden soportar hasta 1,6 g de NaCl/L, pero es más caro. La mejor solución es usar biorreactores fabricados con acero inoxidable resistente hecho a medida o con revestimientos, pero requiere altos costos de inversión (Behrens & Kyle, 1996; da Silva et al., 2019).

Monitoreo del cultivo de microalgas

Es importante monitorear el cultivo de microalgas y la producción de lípidos, ya que una alta proporción de células muertas presentes en cualquier parte del bioproceso será perjudicial, disminuyendo el rendimiento del proceso.

La mayoría de los trabajos que informan sobre la producción de lípidos/DHA a partir de microalgas heterótrofas utilizan métodos tradicionales para vigilar el crecimiento de las microalgas durante el desarrollo del cultivo, como la densidad óptica, el peso de las células secas y el recuento de células. Sin embargo, estas técnicas no proporcionan información sobre el estado fisiológico de las células y esta información es importante cuando las células se cultivan empleando como medios efluentes/residuos/residuos industriales, ya que contienen compuestos inhibidores (Gong et al., 2015; Pleissner et al., 2013).

Generalmente la cuantificación de los lípidos microalgales se realiza mediante métodos de detección gravimétrica de lípidos, pero requieren mucho tiempo, y con frecuencia los resultados sólo están disponibles cuando el proceso ha terminado, siendo imposible cambiar las condiciones de cultivo durante el desarrollo del proceso. Para la caracterización de estos lípidos, tras su extracción, normalmente se emplean métodos como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) que permite el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) (de Swaaf et al., 2003; Liu et al., 2020; Mansour, 2005).

Actualmente se está empezando a emplear la citometría de flujo (FC) porque permite monitorear el cultivo de microalgas casi en tiempo real (en línea); además, las células de microalgas son ideales para este tipo de análisis, ya que son unicelulares y más grandes que la mayoría de los microbios, siendo fácilmente diferenciables del fondo y del ruido. Asimismo, los resultados están disponibles unos minutos después de la recogida de la muestra por lo que es posible cambiar las condiciones operacionales (como la relación carbono/nitrógeno, las tasas de alimentación y de aireación, etc.) durante la evolución del cultivo, a fin de aumentar la producción de lípidos celulares (da Silva et al., 2019)

5.2.2. Fermentación

Antes de la inoculación se requiere una etapa previa de esterilización del cultivo y del equipo para evitar posibles contaminaciones bacterianas. Es una etapa de gran demanda de energía que requiere equipo costoso como autoclaves, cabinas de flujo laminar y calderas, lo que aumenta los costos del proceso a nivel mundial, en particular a gran escala (da Silva et al., 2019). Se están investigando métodos de esterilización de bajo costo, como el uso de hipoclorito de sodio, para reducir dicho costo (Peiris et al., 2012).

Al trabajar con microalgas se opta por una fermentación sumergida típica, que consiste en el cultivo de un microorganismo en un tanque con un medio rico en los nutrientes que ese microorganismo en particular requiere; conforme el microorganismo crece, digiere esos nutrientes y los convierte en más microorganismos o en el producto o productos de interés. El cultivo de microalgas heterótrofas en fermentadores convencionales ha llegado a producir densidades de biomasa superiores a 200 g de peso seco de biomasa por litro de cultivo (Ochsenreither et al., 2016; Ward & Singh, 2005).

5.2.3. Procesamiento posterior

Extracción del aceite

Como se puede observar en la Figura 2, el primer paso tras la fermentación de las microalgas es separar la biomasa del caldo por centrifugación, filtración rotativa al vacío o filtración directa; el sobrenadante puede utilizarse para producir biogás a fin de evitar una etapa de procesamiento adicional para su descarga segura en el sistema de agua de acuerdo con la reglamentación ambiental local (Marques et al., 2018; Ward & Singh, 2005).

Después, normalmente se realiza una etapa de secado para producir una biomasa estable, libre de agua, que pueda ser almacenada durante largos períodos de tiempo sin deteriorarse. Por lo general se utiliza un secado por pulverización o por tambor evitando la exposición de la biomasa a altas temperaturas, ya que los triacilglicéridos (TAG) pueden degradarse a temperaturas superiores a 50 °C (da Silva et al., 2019).

La siguiente etapa consiste en la disrupción de las microalgas para liberar el aceite de las células, se pueden utilizar diversos métodos, como el prensado mecánico, la alta presión, el tratamiento con ultrasonidos, microondas y campos electrónicos pulsados o

la homogeneización. Esta etapa es muy importante porque la eficiencia de la rotura celular influye directamente en las operaciones posteriores y en la eficiencia general de la extracción, un menor tamaño de partícula reduce el tiempo que se requiere para que el solvente pueda alcanzar el equilibrio, así como el necesario para lograr un determinado rendimiento (da Silva et al., 2019; Durán García & Ruiz Navas, 2015; Ochsenreither et al., 2016). Después, se lleva a cabo otra filtración y otra etapa de secado como últimos pasos de pretratamiento.

Por último, para la extracción del aceite el método más utilizado es la extracción con disolvente, siendo los disolventes comunes cloroformo-metanol, hexano o hexano-isopropanol; dependiendo de la polaridad y/o solubilidad de la fracción lipídica, debe elegirse el disolvente o mezcla adecuados para la extracción. Los lípidos microbianos utilizados en aplicaciones alimentarias, nutricionales o farmacéuticas no pueden extraerse con disolventes tóxicos, así que en este caso la extracción con hexano es eficaz y está permitida según el Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, aunque es necesario asegurarse de que no quede ningún disolvente residual en el aceite. El solvente se elimina por destilación (Adarme-Vega et al., 2012; Cuellar-Bermudez et al., 2015; Ochsenreither et al., 2016).

Otra alternativa es el uso de fluidos supercríticos (normalmente CO₂ supercrítico) para la extracción, ya que utiliza presiones y temperaturas bajas, es más selectivo y no se utilizan disolventes tóxicos que puedan dejar residuos en el aceite extraído, aunque esta técnica es más cara (Couto et al., 2010; Ochsenreither et al., 2016).

Hay que tener en cuenta la alta sensibilidad a la degradación de los PUFAs porque una vez que la célula se rompe pierde la protección natural de los antioxidantes existentes en su interior. Si los PUFAs reaccionan con radicales oxidados, se iniciará una reacción en cadena, que dará lugar a aceites rancios y muy olorosos que no son comestibles. Por lo tanto, todos los materiales que pueden desencadenar la reacción de oxidación (e. g. cobre, metal ferroso) deben ser retirados de las zonas en las que se llevará a cabo la extracción y el almacenamiento del aceite. Es aconsejable mantener el aceite de algas crudo en frío, normalmente en un entorno de nitrógeno, antes de la etapa de refinado (da Silva et al., 2019; Ochsenreither et al., 2016).

Concentración/Purificación de PUFAs omega-3

Los métodos más empleados son la winterización y el fraccionamiento de urea, pero se pueden aplicar otros modelos tales como la destilación fraccionada (molecular), la extracción con CO₂ supercrítico o procedimientos que emplean enzimas (hidrólisis de glicéridos, esterificaciones de ácidos grasos) (da Silva et al., 2019; Ward & Singh, 2005).

- Winterización: método sencillo basado en las distintas temperaturas de fusión de los diferentes ácidos grasos. Las temperaturas de fusión dependen del grado de insaturación, entonces se reduce la temperatura del aceite para precipitar los lípidos más saturados.

- Fraccionamiento de urea: técnica eficiente más simple y barata que consiste en la agregación de urea y etanol acuoso. Se reduce la temperatura para cristalizar complejos saturados de urea y después se centrifuga o filtra, quedando los componentes omega-3 en la fracción líquida que se extraen con hexano.

Para obtener fracciones de componentes omega-3 altamente purificados se pueden combinar diferentes métodos (Adarme-Vega et al., 2012; Mendes, da Silva, et al., 2007; Ward & Singh, 2005).

5.3. Mercado de EPA/DHA

El mercado global de EPA/DHA se estima que alcanzará un valor de 3,7 mil millones de euros para el 2025. El aceite microalgal ha registrado los mayores ingresos en 2019 y se estima que crecerá al 9,1% más rápido durante el período 2020-2025. Los principales usos del aceite de DHA son en suplementos dietéticos, alimentos y bebidas, productos farmacéuticos, fórmulas infantiles y piensos.

Debido al potencial del mercado, muchas empresas han manifestado su interés desarrollando procesos, celebrando acuerdos de licencia, fabricando productos, comercializando productos, patentando la propiedad intelectual o impugnando las patentes concedidas. Los principales competidores del producto son: Zymes LLC, Denomega Nutritional Oils, Barleans Organic Oils, Vega Nutritionals Ltd., Arista Industries, Croda International PLC, Copeinca ASA, DSM, Omega Protein Corp,

Horizon Organic, Golden Omega y Pharma Marine USA LLC, entre otros (iCrowd Newswire , 2021).

Destaca la empresa DSM, que compró Martek Biosciences Corporation en 2010, es el mayor productor mundial de DHA a partir de algas. La producción comercial de SCO-DHA para bebés utiliza *Cryptothecodinium cohnii*, presentando un contenido de DHA de 40-45% p/p sin EPA. El mismo grupo produce el aceite *life'sDHA*TM a partir de *Thraustochytrium* y *Schyzochitrium*, el cual contiene un 35% o 40% de DHA, y bajos niveles de EPA (< 2%), en este caso se emplea en las industrias de alimentos, bebidas y suplementos. También produce el aceite *lifesARA*TM a partir de cepas de *Mortierella alpina* que se utiliza en fórmulas infantiles, se suministra en combinación con aceite rico en DHA en diferentes preparaciones comerciales (da Silva et al., 2019).

6. Revisión bibliográfica

6.1. Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3 desempeñan funciones importantes como componentes estructurales de los fosfolípidos de membrana y como precursores de los eicosanoides, los cuales influyen en el sistema cardiovascular, el sistema inmunológico, el sistema nervioso central, el cerebro y están involucrados en reacciones inflamatorias, por tanto, son importantes para la salud humana (Cuellar-Bermudez et al., 2015; da Silva et al., 2006, 2019; Vonshak, 1990; Ward & Singh, 2005).

La producción microbiana de SCO rico en PUFAs omega-3 ofrece varias ventajas en comparación con el uso de fuentes animales o vegetales: el cultivo de microorganismos es independiente de las condiciones climáticas, tiene períodos de producción cortos y se pueden utilizar varios sustratos, incluidos los desechos industriales (Cuellar-Bermudez et al., 2015; Liu et al., 2020; Ochsenreither et al., 2016).

A pesar de que en los últimos años y décadas el interés por el aceite de microalgas rico en compuestos omega-3 ha aumentado, su producción sigue siendo más cara que la de los aceites de pescado (Liu et al., 2020). Una posible estrategia para hacer que este proceso sea más competitivo consiste en valorizar los múltiples productos obtenidos de las microalgas acercándose al concepto de biorrefinería, basado en los principios de la bioeconomía circular, que tiene por objeto la generación de residuos cero, y abordan tres grandes áreas de importancia en la sociedad humana: la salud humana, la alimentación y la seguridad del medio ambiente (Adarme-Vega et al., 2012; da Silva et al., 2019; Perez-Garcia et al., 2011; Ward & Singh, 2005).

Toda la biomasa de las microalgas puede ser utilizada por las industrias alimentaria, de piensos y agrícola; las industrias farmacéutica y nutracéutica utilizan productos lipídicos microalgales de alto valor añadido como PUFAs omega-3 y carotenoides; la industria del transporte puede utilizar ácidos grasos de cadena corta menos insaturados para la producción de biodiésel; la industria química puede utilizar productos como el glicerol derivado de la industria del biodiésel; y los restos de biomasa desaceitada, ricos en carbohidratos, proteínas y minerales, pueden utilizarse como pienso, fertilizante y sustrato para la producción de biometano (da Silva & Reis, 2015; Vonshak, 1990).

Además, la conversión termoquímica de esta biomasa agotada puede generar combustibles y otros productos químicos (Figura 2).

La mayor parte del aceite rico en PUFAs omega-3, en términos de valor, se usa en suplementos dietéticos (43%), industria farmacéutica (23%) y preparados para lactantes o fórmulas infantiles (14%). En estos sectores es más usado el aceite rico en DHA, por lo que este trabajo se centrará en la producción del mismo. El productor de DHA más destacado entre las microalgas es el dinoflagelado heterotrófo *Cryptocodinium cohnii*, aunque géneros de microalgas como *Aurantiochytrium*, *Schizochytrium* y *Thraustochytrium* también son productores importantes (Abad & Turon, 2015; da Silva et al., 2006, 2019; Diao et al., 2018; Ganuza et al., 2008; Guo et al., 2018; Liu et al., 2020; Mendes, Guerra, et al., 2007; Rumiani et al., 2018; Safdar, Shamoan, et al., 2017; Song et al., 2020; Ward & Singh, 2005; Wu et al., 2005; Zhu et al., 2007).

El tipo de fermentación, la especie de microalga y las condiciones de trabajo determinan el rendimiento y la composición de los lípidos microalgales obtenidos. Para la recuperación de dichos lípidos el método óptimo debe determinarse para cada especie por separado, pero debe permitir una eliminación rápida, reproducible, cuantitativa, rentable y no tóxica en condiciones suaves para prevenir el daño oxidativo de los PUFAs.

Por lo tanto, esta revisión tiene como objetivo seleccionar la especie de microalga más adecuada para obtener una buena productividad de PUFAs omega-3 (en concreto de DHA), encontrar un sustrato residual adecuado para dicha especie, obtener datos cinéticos para el modelado y diseño del biorreactor e identificar las condiciones óptimas del bioproceso.

6.2. Metodología

La revisión bibliográfica se ha llevado a cabo mediante la búsqueda de artículos, informes y libros sobre el tema publicados hasta julio de 2021 en bases de datos tales como Pubmed, Scopus, ScienceDirect y SpringerLink. Los criterios de búsqueda se han basado en palabras clave como “polyunsaturated fatty acid (PUFA)”, “docosahexaenoic acid (DHA)”, “heterotrophic microalgae”, “*Cryptocodinium cohnii*”, “*Thraustochytrium*”, “*Schizochytrium*” “*Aurantiochytrium*” y “kinetic”.

6.3. Desarrollo y discusión

6.3.1. Microalgas heterótrofas productoras de DHA

El número actual de microalgas comercialmente importantes que son capaces de crecer en condiciones heterótrofas es muy limitado. Según la información recabada de la literatura, las microalgas heterótrofas más utilizadas para la producción de aceite y biomasa de algas ricas en compuestos omega-3 son miembros marinos de las familias Thraustochytriaceae (*Aurantiochytrium*, *Schizochytrium* y *Traustochytrium*) y Crypthecodiniaceae (*Crypthecodinium*). En concreto, los géneros *Schizochytrium* y *Crypthecodinium* presentan altos rendimientos de DHA (Abad & Turon, 2015; da Silva et al., 2006, 2019; Diao et al., 2018; Ganuza et al., 2008; Guo et al., 2018; Liu et al., 2020; Mendes, Guerra, et al., 2007; Rumiani et al., 2018; Safdar, Shamooun, et al., 2017; Song et al., 2020; Ward & Singh, 2005; Wu et al., 2005; Zhu et al., 2007).

A continuación, se muestran las principales características de dichos géneros, con el fin de seleccionar una especie adecuada con la que trabajar en el presente proyecto.

Crypthecodinium

El género *Crypthecodinium* pertenece a la familia Crypthecodiniaceae del orden de los Gonyaulacales. Son dinoflagelados eucariotas que incluye especies heterótrofas fáciles de cultivar (Gómez et al., 2011).

Para el tema de estudio destaca *Crypthecodinium cohnii*, ya que fue la primera especie microbiana utilizada en la producción comercial de DHA para fórmulas infantiles debido a su bajo contenido en EPA.

Con este dinoflagelado heterótrofo se logran altas densidades de biomasa y productividades de DHA comercialmente aceptables en medios donde la concentración de carbono (e. g. glucosa, dextrosa, etanol, ácido acético, acetato de sodio), la agitación, la aireación, la salinidad, el pH y la temperatura se controlan en condiciones deficientes en nitrógeno (e. g. extracto de levadura, extracto de carne, ácido glutámico, cloruro de amonio) (Rumiani et al., 2018).

Por lo general, son de crecimiento lento y sensibles al cizallamiento, así que la agitación para lograr la oxigenación puede retrasar el crecimiento. La salinidad también influye en el crecimiento y la producción de DHA, una alta salinidad provoca un aumento de la fase de latencia (Rumiani et al., 2018). Se logran mayores productividades de DHA con alimentaciones de acetato o etanol, en lugar de glucosa, la temperatura óptima se encuentra alrededor de 28 °C y el rango de pH óptimo coincide con 7-7,8 (Bumbak et al., 2011; Liu et al., 2020).

El principal método de trabajo para esta especie fue descrito por Kyle (1994), y según el mismo se puede llegar a producir biomasa en un rango de 20-40 g/L con un 20-30% (p/p) de aceite en un período de incubación de 3 a 5 días, conteniendo un 35% de DHA en el aceite (Ward & Singh, 2005).

Por otro lado, en la búsqueda de fuentes de carbono alternativas de fácil manejo y baratas se ha demostrado que se puede utilizar un medio a base de jarabe de dátiles para el cultivo de *C. cohnii* ATCC 30556, es interesante porque puede aportar la mayoría de minerales y sales necesarios; además, los dátiles de desecho son un sustrato barato y económico. La cantidad máxima de biomasa obtenida fue de 6,65 g/L y corresponde con el empleo del medio optimizado: 17 g/L de jarabe de dátil, 2 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de sal marina (Rumiani et al., 2018).

Otro estudio demuestra que el jarabe de pulpa de algarroba podría utilizarse como medio de cultivo para *C. cohnii* CCMP 316. Se logró una concentración de biomasa de 42 g/L después de 100,4 h correspondiendo el 48% de sus ácidos grasos con DHA. La composición del medio de cultivo fue: inóculo, (10% v/v); jarabe de pulpa de algarrobo, 119 mL (dilución 1:10,5 v/v); sal marina, 25 g/L y extracto de levadura, 2 g/L (Mendes, Guerra, et al., 2007).

Schizochytrium

El género *Schizochytrium* (*Esquizoquitrios*) pertenece a la familia Thraustochytriaceae del orden de los Laberintales. Son unicelulares eucariotas marinos fáciles de cultivar que pueden crecer en un amplio rango de salinidad, lo cual es una ventaja significativa para la producción comercial.

Se obtienen rendimientos y productividades de DHA muy elevados mediante el control de la temperatura y el pH, así como de las concentraciones de oxígeno y de las fuentes de carbono y nitrógeno. Se ha demostrado que las especies *Schizochytrium* S9, *Schizochytrium* S31, *Schizochytrium* G13/2S, *S. aggregatum*, *S. limacinum* y *S. mangrovei* son capaces de producir más del 80% de sus ácidos grasos omega-3 como DHA. Además, el uso de *Esquizoquitrios* ofrece la posibilidad de producir la combinación deseada de ARA y DHA para el uso en fórmulas de leche y alimentos para bebés a partir de una única cepa (Ward & Singh, 2005).

Sobre todo destaca *Schizochytrium limacinum*, un estudio demuestra que, para obtener un buen crecimiento celular (25 g/L), una gran cantidad de lípidos (10 g/L) y una composición de ácidos grasos relativamente estable (35% de ácidos grasos totales corresponden con DHA) a partir de *S. limacinum* OUC88 cultivada en un medio basal GS (60 g/L de glucosa, 40 g/L de hidrolizado de torta de soja, 50% (v/v) de agua de mar natural y pH 7,0) el rango de temperaturas óptimas corresponde con 16-30 °C y la salinidad debe estar a 0,9–3,6% (p/v) (Zhu et al., 2007).

Abad y Turon demostraron que *Aurantiochytrium limacinum* SR21 (anteriormente *Schizochytrium limacinum* SR21 y rebautizada por Yokoyama y Honda en 2007 basándose en la filogenia del gen ARNr 18S y otras características) ofrece valores similares de rendimiento de biomasa y producto, tasa de crecimiento neto y productividad de DHA utilizando glucosa, glicerol puro y glicerol crudo como fuente de carbono. Este hecho ofrece la posibilidad de valorizar el glicerol producido como subproducto en la producción de biodiésel (Abad & Turon, 2015).

Además, esta especie encaja perfectamente dentro del concepto de biorrefinería, ya que es capaz de coproducir tanto PUFAs omega-3 (39-48% w/w como DHA), como ácidos grasos de cadena más corta que son menos insaturados y adecuados para la producción de biodiésel (da Silva et al., 2019).

Para escoger la especie que mejor se ajusta a los requisitos del presente proyecto entre *Cryptocodinium cohnii* y *Aurantiochytrium limacinum*, a parte del estudio bibliográfico, se ha implementado una simulación del proceso con la herramienta Matlab 2016® (Anexo I).

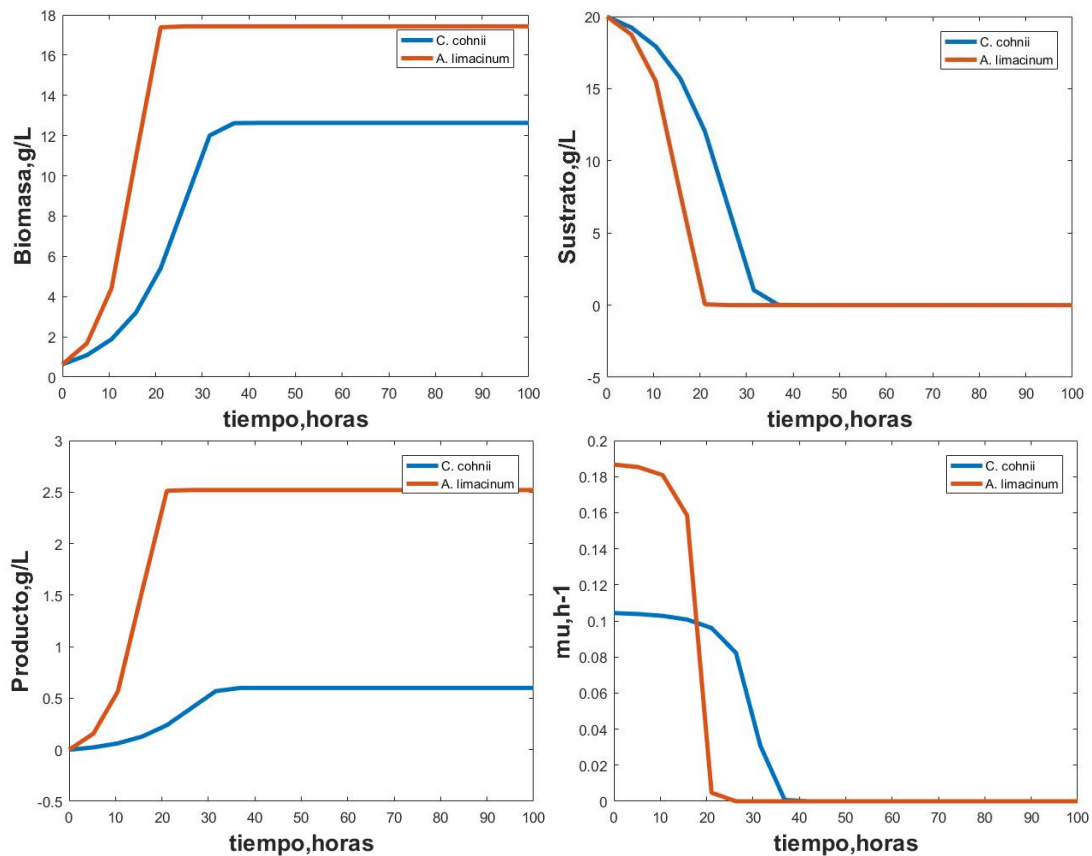


Figura 3. Evolución de la biomasa, el sustrato, el producto y la velocidad específica de crecimiento (μ) de *Crypthecodinium cohnii* y *Aurantiochytrium limacinum* operando en batch con las mismas condiciones iniciales.

Finalmente, la opción elegida es *Aurantiochytrium limacinum*, ya que, como se muestra en la Figura 3 presenta mejores resultados. A las 30 horas se obtiene una concentración de 2,5 g/L de producto, frente a los 0,5 g/L conseguidos con *Crypthecodinium cohnii*.

6.3.2. Producción industrial de aceite rico en PUFAs-omega 3 a partir de *Aurantiochytrium limacinum*

6.3.2.1. Fermentación

Selección del tipo de reactor y el modo de operación

Al trabajar con microalgas heterótrofas se opta por una fermentación sumergida típica en fermentadores convencionales. Además, para el proceso propuesto en el presente Trabajo Fin de Grado se recomienda que la fermentación se lleve a cabo en dos etapas: una primera fase de crecimiento activo y una segunda en la que se promueve la producción y acumulación de lípidos ricos en DHA (da Silva et al., 2006; Ochsenreither et al., 2016).

A pesar de que el proceso se puede llevar a cabo en régimen continuo, semicontinuo y discontinuo; el proceso continuo resulta más eficiente económica y operacionalmente. Es más productivo y más fácil de automatizar para obtener productos de calidad constante; además, permite tratar grandes caudales de materia prima, elegir la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos y mantener la población en un estado fisiológico definido, constante y seleccionable.

Teniendo en cuenta la información de los párrafos anteriores, el tipo de reactor que mejor se ajusta a las condiciones de trabajo es un reactor de tanque agitado (RTA), que es el modelo real derivado del reactor ideal de mezcla completa (RMC).

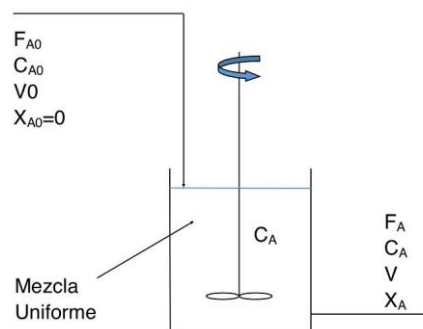


Figura 4. Esquema RMC.

Este tipo de reactores (Figura 4) se caracteriza porque en todos los puntos de su interior existe la misma concentración de reactivos y productos, es decir, es homogéneo. Para mantener dicha homogeneidad es necesario un sistema de agitación; además, en los RMC la temperatura, las concentraciones de la alimentación y los caudales son las variables de operación. La corriente de salida se caracteriza por tener la misma temperatura y concentración que el interior del reactor al finalizar la reacción.

El modo de operación elegido inicialmente para llevar a cabo el proceso consiste en el recomendado por la bibliografía, dos RTA en serie trabajando en continuo (Figura 5), el primero con el objetivo de obtener biomasa (nutrientes en exceso) y el segundo de producir gran cantidad de PUFAs omega-3 (fuente de nitrógeno limitada).

Tabla 2. Resultados obtenidos tras la simulación en Matlab 2016® de los tres modos de operación estudiados.

	2 RTA en serie		1 RTA	2 RTA en serie, 2º alimentado	
	RTA 1	RTA 2		RTA 1	RTA 2
X (kg/m³)	114,64	128,00	114,64	114,64	128,00
S (kg/m³)	28,52	12,63	28,52	28,52	32,62
N (kg/m³)	3,34	0,00	3,34	3,34	0,00
P (kg/m³)	17,20	19,20	17,20	17,20	19,20

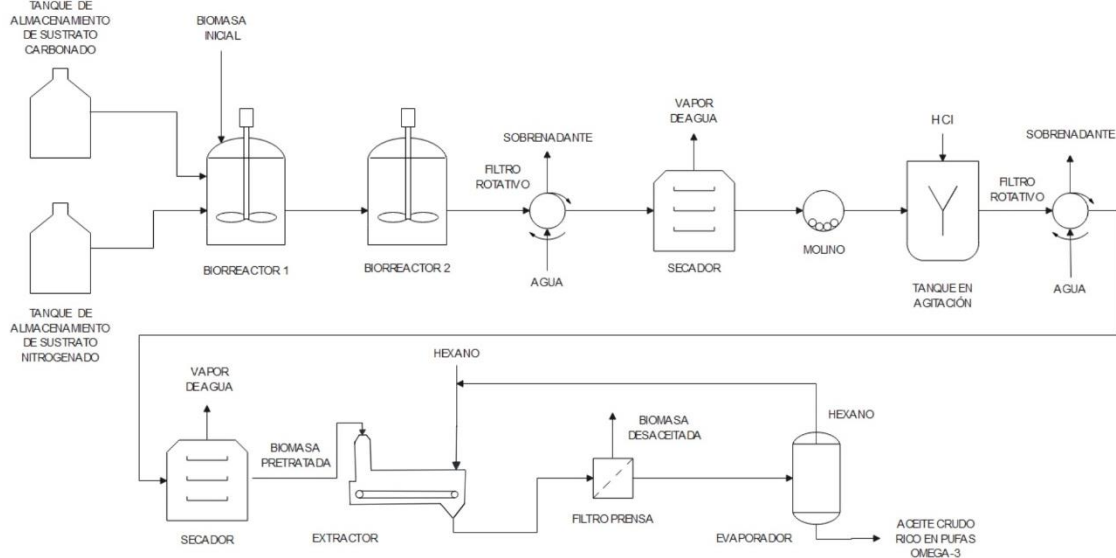


Figura 5. Diagrama del proceso con 2 RTA en serie (realizado con la herramienta EdrawMax®).

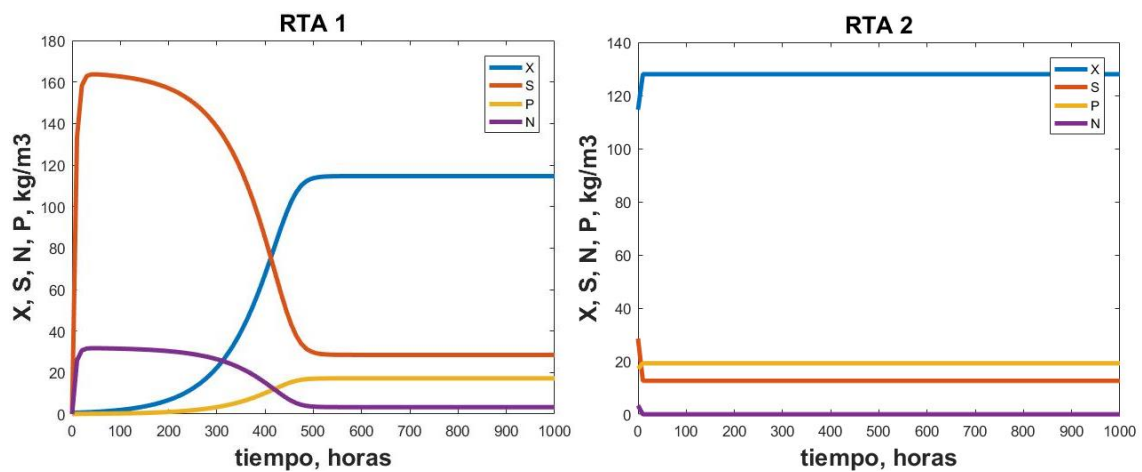


Figura 6. Representación gráfica del proceso en los 2 RTA dispuestos en serie.

Tanto en la Tabla 2 como en la Figura 6, se muestra que el aumento de la concentración de producto en la salida del segundo biorreactor respecto al primero es insignificante (2 g/L más en la salida del segundo), por lo que se procede a estudiar dos alternativas distintas:

- Llevar a cabo la fermentación en 2 RTA en serie con el segundo alimentado con la fuente de carbono (Figura 7).

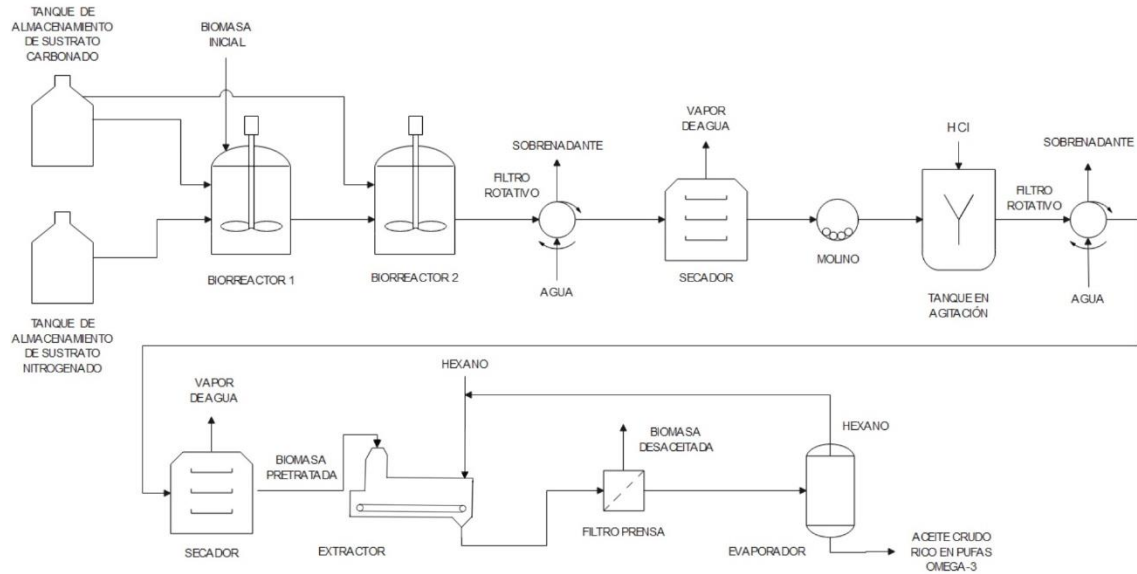


Figura 7. Diagrama del proceso con 2 RTA en serie con el segundo alimentado con la fuente de carbono (realizado con la herramienta EdrawMax®).

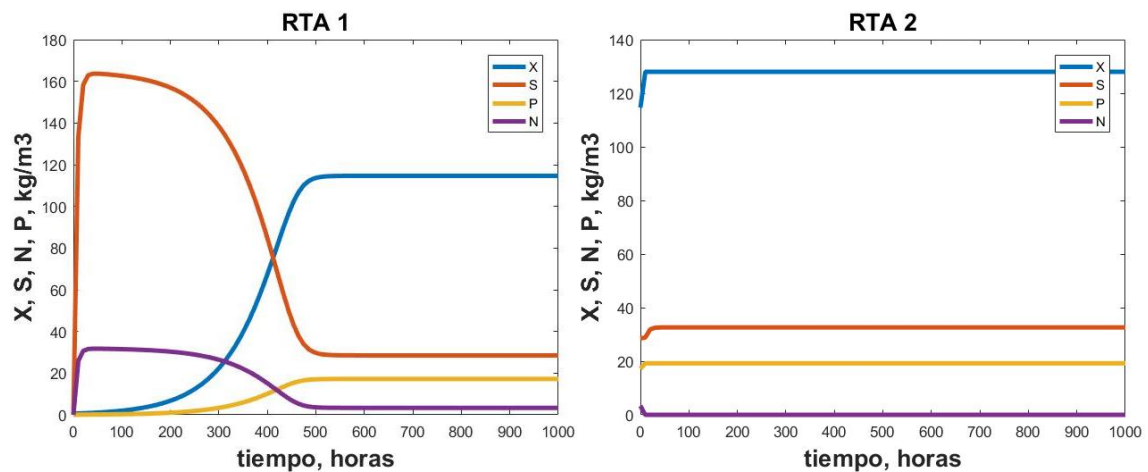


Figura 8. Representación gráfica del proceso en los dos RTA dispuestos en serie con el segundo alimentado.

Se consideró que el segundo reactor se alimentaría con una concentración total de 48,5 kg/m³ de sustrato carbonado, en comparación con los 28,5 kg/m³ de la disposición anterior. El resultado, reflejado en la Tabla 2 y en la Figura 8, muestra que la concentración de DHA obtenida tampoco varía significativamente, además, se produce una acumulación de la fuente de carbono que se traduce en un derroche de materia prima, y a su vez de dinero.

También hay que tener en cuenta el costo que supondría la fabricación de ese segundo biorreactor y sus gastos de operación, que serían muy elevados para aumentar ínfimamente la productividad.

- Llevar a cabo la fermentación en 1 RTA (Figura 9).

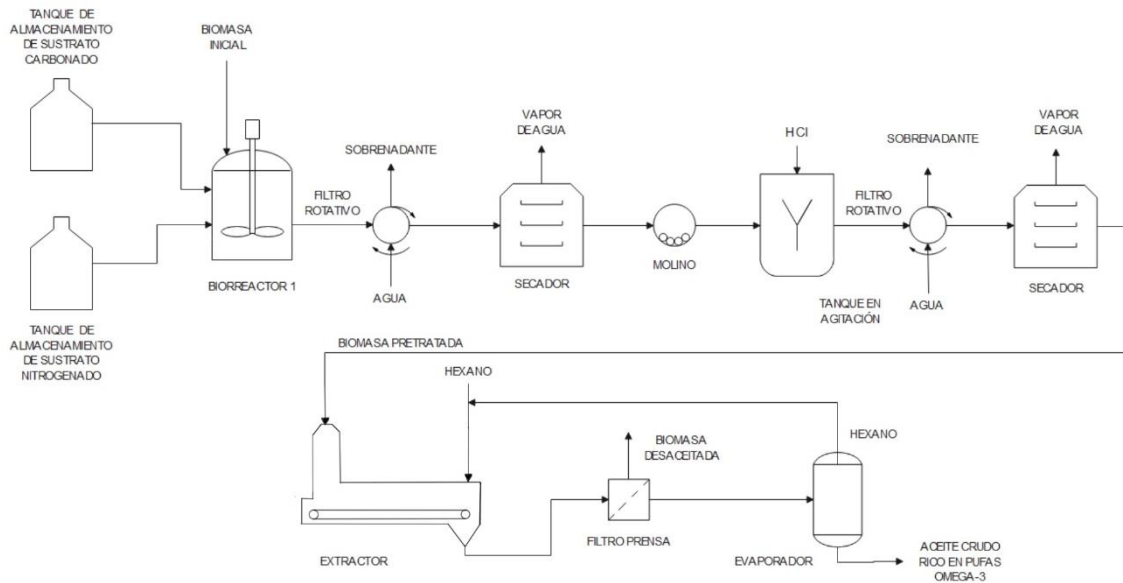


Figura 9. Diagrama del proceso con 1 RTA (realizado con la herramienta EdrawMax®).

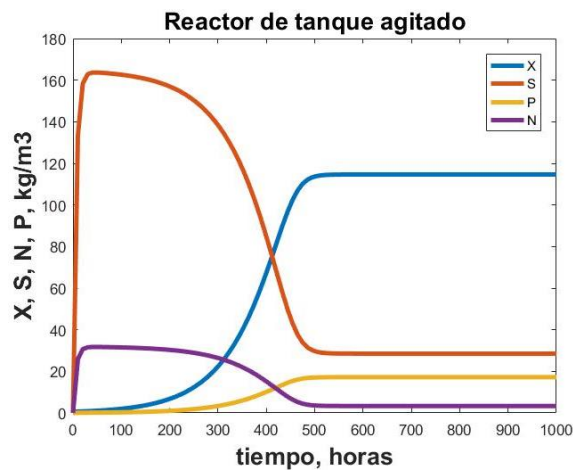


Figura 10. Representación gráfica del proceso en 1 RTA.

Finalmente, se elige la opción de operar con un solo reactor de tanque agitado, ya que el aumento de concentración final de producto en las opciones con dos reactores de tanque

agitado en serie no es significativo y la inversión en la fabricación y operabilidad del segundo reactor sí sería importante (comportamiento reflejado en la Figura 10 y concentraciones de las corrientes de salida en la Tabla 2).

Modelo matemático. Cinética del proceso

El carbono orgánico de moléculas complejas se metaboliza en las microalgas heterótrofas por la ruta de la glucólisis o de la pentosa fosfato.

En general, los organismos oleaginosos dependen del adenosín monofosfato (AMP) de la isocitrato deshidrogenasa (IDH), una enzima del ácido cítrico, que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato. En condiciones de exceso de carbono y limitación de nitrógeno el AMP se convierte en inosina monofosfato (IMP) y amoníaco, lo que causa el agotamiento de los niveles de AMP bloqueando así el metabolismo del isocitrato y dando lugar a su acumulación en la mitocondria.

El exceso de isocitrato se transporta al citosol donde se descompone dando como resultado la síntesis de acetyl-CoA para la producción de ácidos grasos; en el caso de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, incluyendo PUFAs, se requieren varias series de elongación y desaturación (da Silva et al., 2019).

Para el modelaje del proceso hay que considerar que la cinética microbiana se describe por el modelo de Monod, cuyas ecuaciones para el sistema de dos reactores de tanque agitado en serie se muestran a continuación (los subíndices 1 y 2 hacen referencia al RTA 1 y RTA 2, respectivamente). Se estudia la evolución del nitrógeno porque como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que esta especie aumenta la producción de PUFAs omega-3 en condiciones deficientes de nitrógeno.

Para el crecimiento de la biomasa:

$$\frac{dX_1}{dt} = (\mu_1 - D_1) \cdot X_1 \quad \text{siendo} \quad \mu_1 = \mu_{\max 1} \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \frac{N_1}{K_{N1} + N_1}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = D_2 \cdot (X_1 - X_2) + \mu_2 \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad \mu_2 = \mu_{\max 2} \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \frac{N_2}{K_{N2} + N_2}$$

Para el consumo de la fuente de carbono:

$$\frac{dS_1}{dt} = D_1 \cdot (S_{e1} - S_1) - q_{S1} \cdot X_1 \quad \text{siendo} \quad q_{S1} = \frac{\mu_1}{Y'_{X/S1}} + m_{S1}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = D_2 \cdot (S_1 - S_2) - q_{S2} \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad q_{S2} = \frac{\mu_2}{Y'_{X/S2}} + m_{S2}$$

Para el consumo de la fuente de nitrógeno:

$$\frac{dN_1}{dt} = D_1 \cdot (N_{e1} - N_1) - q_{N1} \cdot X_1 \quad \text{siendo} \quad q_{N1} = \frac{\mu_1}{Y'_{X/N1}} + m_{N1}$$

$$\frac{dN_2}{dt} = D_2 \cdot (N_1 - N_2) - q_{N2} \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad q_{N2} = \frac{\mu_2}{Y'_{X/N2}} + m_{N2}$$

Para la formación de producto:

$$\frac{dP_1}{dt} = q_{P1} \cdot X_1 - D_1 \cdot P_1 \quad \text{siendo} \quad q_{P1} = \alpha_1 \mu_1 + \beta_1$$

$$\frac{dP_2}{dt} = D_2 \cdot (P_1 - P_2) + q_{P2} \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad q_{P2} = \alpha_2 \mu_2 + \beta_2$$

Tasas de dilución:

$$D_1 = \frac{V_1}{Q_1} \qquad D_2 = \frac{V_2}{Q_2}$$

Donde:

- t es el tiempo (h)
- X_i es la concentración de biomasa (kg/m^3)
- μ_i es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
- $\mu_{\text{máxi}}$ es la velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1})

- S_i es la concentración de la fuente de carbono (kg/m^3)
- K_{S_i} es la constante de saturación (kg/m^3)
- q_{S_i} es la velocidad específica de consumo de fuente de carbono (kg/kg h)
- Y'_{X/S_i} es el factor de rendimiento biomasa fuente de carbono (kg/kg)
- m_{S_i} es el coeficiente de mantenimiento de células (kg/kg h)
- N_i es la concentración de la fuente de nitrógeno (kg/m^3)
- q_{N_i} es la velocidad específica de consumo de fuente de nitrógeno (kg/kg h)
- Y'_{X/N_i} es el factor de rendimiento biomasa fuente de nitrógeno (kg/kg)
- m_{N_i} es el coeficiente de mantenimiento de células (kg/kg h)
- P_i es la concentración de producto (kg/m^3)
- q_{P_i} es la velocidad específica de formación de producto (kg/kg h)
- α_i es la constante de formación de producto asociada al crecimiento (kg/kg)
- β_i es la constante de formación de producto no asociada al crecimiento (kg/kg h)
- D_i es la tasa de dilución (h^{-1})

Los parámetros cinéticos característicos del proceso mostrados en la Tabla 3 se han obtenido de la literatura (Abad & Turon, 2015).

Tabla 3. Parámetros cinéticos característicos del proceso.

$\mu_{\text{máx}} = 0,18 \text{ h}^{-1}$
$K_S = 2,5 \text{ kg/m}^3$
$K_N = 0,01 \text{ kg/m}^3$
$Y_{X/S} = 0,84 \text{ kg/kg}$
$m_S = 0 \text{ kg/kg}$
$Y_{X/N} = 4 \text{ kg/kg}$
$m_N = 0 \text{ kg/kg}$
$\alpha = 0,15 \text{ kg/kg}$
$\beta = 0 \text{ kg/kg h}$

Conocidos los valores anteriores y las ecuaciones que definen el sistema, se realizan las distintas simulaciones del proceso en la herramienta Matlab 2016® según los diferentes modos de operación, los resultados se muestran en la Tabla 2.

La configuración del sistema seleccionada para llevar a cabo el proceso es un reactor continuo de tanque agitado, y su comportamiento en estado estacionario se muestra en la Figura 11.

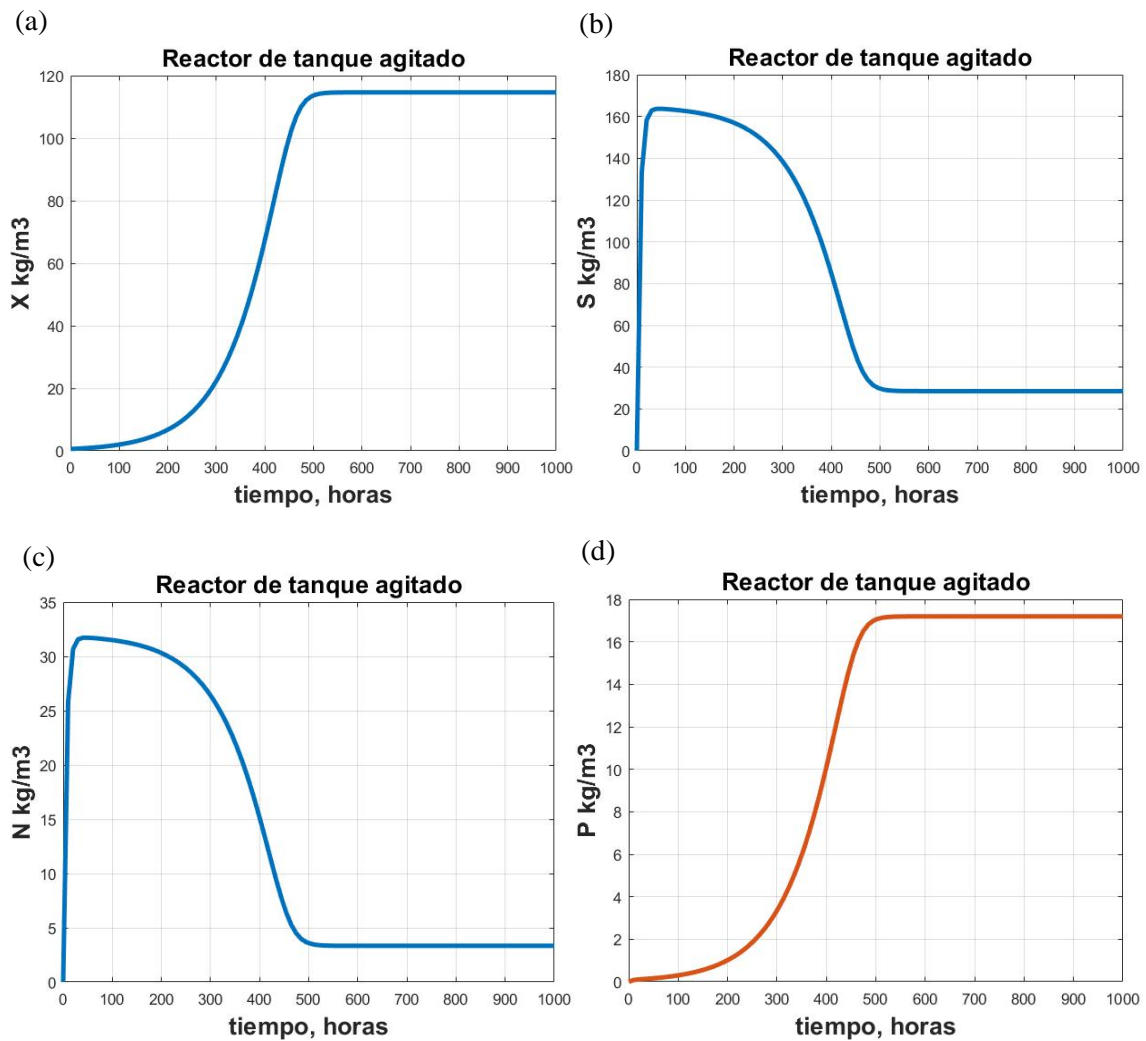


Figura 11. Evolución de (a) la biomasa (*Aurantiochytrium limacinum*), (b) el sustrato carbonado, (c) el sustrato nitrogenado y (d) el producto en un reactor de tanque agitado operando en continuo.

Finalmente, el comportamiento del sistema de estudio viene definido por las ecuaciones 1, 2, 3 y 4:

$$\frac{dX}{dt} = \left(0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N} - D \right) \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_e - S) - \left(\frac{0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N}}{0,84} \right) \cdot X \quad (2)$$

$$\frac{dN}{dt} = D \cdot (N_e - N) - \left(\frac{0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N}}{4} \right) \cdot X \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(0,15 \cdot 0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N} \right) \cdot X - D \cdot P \quad (4)$$

Condiciones de cultivo

Para el proceso se utiliza *Aurantiochytrium limacinum* SR21 (ATCC-MYA-1381) de la *American Type Culture Collection* cuyo medio de cultivo básico recomendado (*ATCC Medium: 790 By + Medium*) consta de agua marina artificial, glucosa, extracto de levadura y peptona.

Considerando la posibilidad de emplear un sustrato residual, consta que el glicerol crudo derivado de la producción de biodiesel ofrece rendimientos de biomasa similares a los alcanzados utilizando glucosa (Abad & Turon, 2015). Sin embargo, existen variaciones considerables en el rendimiento y la productividad de DHA dependiendo de la fuente de glicerol, así que se opta por seguir las recomendaciones de cultivo y se usa glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura y peptona como fuentes de nitrógeno.

Para conocer los valores óptimos de la tasa de dilución (D), la concentración de glucosa en la entrada (S_e) y la concentración de nitrógeno en la entrada (N_e) se ha llevado a cabo un estudio, mostrado con detalle en el Anexo III, cuyos resultados son 0,165 h⁻¹, 165 kg/m³ y 32 kg/m³ respectivamente. Con estas condiciones y partiendo de una concentración inicial de biomasa de 0,63 kg/m³, se alcanza el estado estacionario aproximadamente a 500 h como se muestra en la Figura 11.

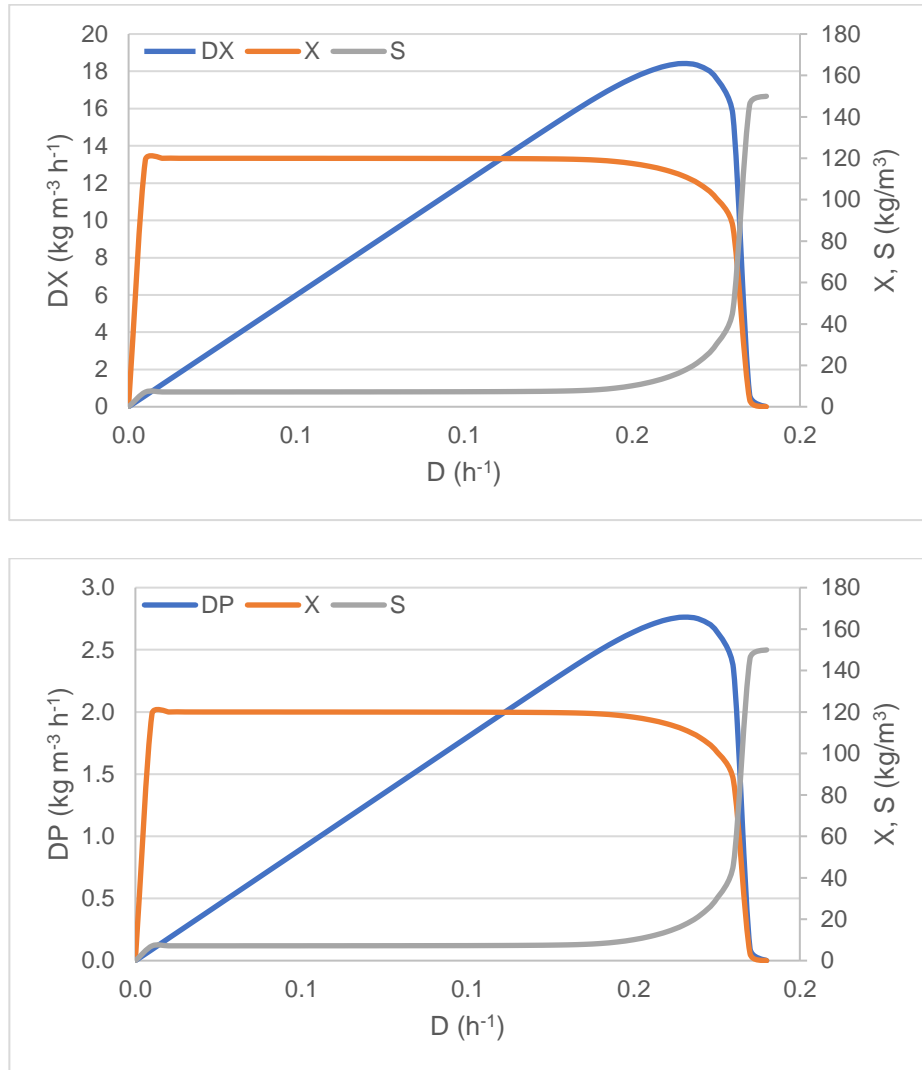


Figura 12. Factor de dilución óptimo.

La Figura 12 muestra las dos gráficas empleadas para obtener el valor del factor de dilución óptimo para el proceso, en la primera se representa frente a la productividad de biomasa (DX) y en la segunda frente a la productividad de DHA (DP).

Se trabaja en condiciones estándar de presión y temperatura, es decir, a 1 atm y 25 °C. Para una correcta homogenización del medio y evitar una posible sedimentación, se emplea un agitador a 150 rpm y se mantiene una aireación de 1vvm. En cuanto al pH, debe mantenerse en torno a 6,5. Es recomendable añadir cierta cantidad de antiespumante al medio.

Durante todo el proceso es necesario mantener las condiciones operacionales en los valores adecuados, para asegurar que se trabaja en estado estacionario y se obtiene la productividad calculada en la simulación.

Las principales variables que se verifican son los caudales de alimentación, las concentraciones de las corrientes de alimentación, la concentración de la corriente de salida, el nivel de oxígeno en el interior del reactor, el pH y la temperatura.

Todos los procesos unitarios deben incorporar sistemas de medición de cada una de las variables mencionadas anteriormente (caudalímetro, electrodo de pH, oxímetro y termopares entre otros) complementarios a los sistemas de control, para detectar la anomalía y mandar la señal a los sistemas de control.

6.3.2.2. Extracción de aceite

La extracción del aceite se va a realizar siguiendo el método de extracción sólido-líquido, que es una operación unitaria en la que se transfieren uno o más compuestos (soluto) contenidos en una sustancia sólida (inerte) a un líquido (disolvente).

Se ha optado por utilizar hexano como disolvente (solvente apolar-aprótico), ya que nuestro producto de interés (DHA) va destinado a aplicaciones alimentarias, nutricionales o farmacéuticas y, por tanto, no se pueden usar disolventes tóxicos (Ochsenreither et al., 2016).

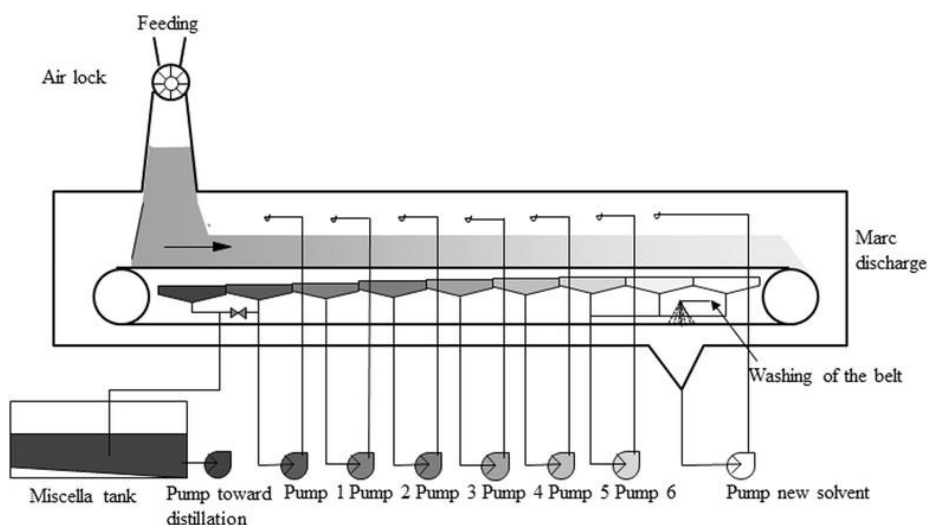


Figura 13. Extractor horizontal tipo de Smet.

El proceso se puede llevar a cabo en continuo o por cargas, y el equipo puede ser un lecho estacionario de sólidos, lecho móvil o tanque agitado. Para este proyecto se ha optado por usar un extractor continuo horizontal tipo de Smet, como el que aparece en la Figura 13, donde el material sólido se transporta en bandejas y se pone en contacto con el solvente en contracorriente (Durán García & Ruiz Navas, 2015; Expósito, 2013).

Una vez agotado el aceite de la masa extractada se filtra y la mezcla disolvente-aceite se lleva a un evaporador, donde la corriente de cola es el producto de interés, aceite crudo rico en DHA, y la de cabeza se compone por el solvente, que se recirculará al extractor.

Finalmente, el aceite crudo obtenido se almacena en tanques para ser vendidos posteriormente a plantas de refino, ya que después de la extracción, la fracción de PUFAs todavía no es apta para el consumo humano debido a la presencia de impurezas, olor, sabor y aspecto turbio (Lopes da Silva, Moniz, Silva, & Reis, 2019).

6.4. Perspectivas de futuro

Las personas están tomando conciencia de la importancia de la dieta para el bienestar físico y mental, y la continua publicación de evidencias de los efectos beneficiosos para la salud de los PUFAs omega-3 ha captado la atención no solo de la comunidad médica sino también del público en general. Así que, los principales mercados de crecimiento futuro para los PUFAs están relacionados con la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria (a través de suplementos dietéticos para aumentar la ingesta de estos compuestos) (da Silva et al., 2019).

Los avances en las metodologías genéticas y celulares, conducen a mejores sistemas de producción. Las áreas de investigación futuras relacionadas con la producción de SCO incluyen: mayor desarrollo de las cepas de *Schizochytrium* para producir selectivamente niveles más altos de ácidos grasos; mayor aislamiento de nuevos *Traustochytridos* e investigación de las propiedades y aplicaciones potenciales de algas heterótrofas manipuladas genéticamente, creadas a partir de especies fototróficas (Hu et al., 2018; Ward & Singh, 2005).

También hay que enfocarse en desarrollar un procesamiento posterior a gran escala de los compuestos de alto valor de las microalgas económicamente viable y respetuoso con

el medio ambiente, debe reducirse la pérdida de producto y los costos de equipo y energía asociados con los pasos de extracción y purificación. Asimismo, conviene realizar estudios con aditivos o conservantes en extractos para evitar la oxidación de los PUFAs.

La mayoría de las empresas mundiales que comercializan productos a partir de microalgas comenzaron a producir combustibles para el sector del transporte (biodiesel, jet fuel); sin embargo, como el proceso de producción no es económicamente competitivo con los combustibles derivados del petróleo, estas empresas han invertido en la producción de otros compuestos como pigmentos y ácidos grasos, ya que estos productos tienen alta demanda y precio de comercialización. Esta forma de trabajar cuya finalidad es aprovechar al máximo la biomasa de las microalgas, entra dentro del concepto de biorrefinería (Cuellar et al., 2014).

El futuro sistema de referencia industrial para la producción de PUFAs omega-3 consiste en mezclar aceites microalgales con aceites residuales de la industria pesquera para obtener una fracción común de concentrado de compuestos omega-3. Sin embargo, esta mezcla no sería adecuada para incorporarse a los alimentos, concretamente a las fórmulas infantiles, o para utilizarlos en formulaciones farmacéuticas, a menos que se utilicen costosas etapas de concentración/purificación (da Silva et al., 2019; van der Voort et al., 2017).

7. Conclusiones

En base a lo descrito en el epígrafe anterior se llega a la conclusión de que *Aurantiochytrium limacinum* es adecuada para la producción de aceite rico en PUFAs omega-3. En cuanto al modo de operación, se ha concluido que la mejor opción es operar de forma continua con un reactor de tanque agitado, ya que se ha comprobado mediante simulaciones del proceso en Matlab 2016® que la concentración de producto al final del proceso operando con dos reactores de tanque agitado en serie aumenta muy poco y el costo de fabricación de un segundo biorreactor junto con sus gastos de operación serían muy elevados.

El sistema alcanza el estado estacionario en unas 500 h, por lo que se toma este valor como el tiempo de operación. En ese tiempo se obtiene una concentración final de biomasa (X) de 114,64 kg/m³, de glucosa (S) de 28,52 kg/m³, de fuente de nitrógeno (N) de 3,34 kg/m³ y de DHA (P) de 17,20 kg/m³.

Para este tipo de procesos es necesario un buen sistema de agitación para fomentar la homogeneidad y evitar sedimentos, además al trabajar con una especie heterótrofa se requiere una buena oxigenación. Por tanto, el biorreactor dispondrá de un impulsor dispuesto a 150 rpm y un caudal de aire de 1 vvm.

Por último, se ha determinado que la extracción del aceite se va a realizar siguiendo el método de extracción con disolvente utilizando hexano, ya que nuestro producto de interés (PUFAs omega-3) va destinado a aplicaciones alimentarias, nutricionales o farmacéuticas y no se pueden usar disolventes tóxicos.

8. Ubicación

Se propone ubicar el proceso propuesto en el presente Proyecto en la Planta Industrial de Arcos de la Frontera (Cádiz), perteneciente a AlgaEnergy e Iberdrola, cuyo objetivo es la producción industrial de microalgas con destino comercial y la biofijación del CO₂ procedente de la Central de Ciclo Combinado de Iberdrola.

AlgaEnergy es una empresa enfocada en el escalado de procesos de cultivo de microalgas para poner en el mercado productos innovadores, competitivos, sostenibles y eficaces; por tanto, este Proyecto sería complementario al mencionado en el párrafo anterior, sería una expansión de la planta para trabajar a nivel industrial en otro de los nichos actuales en el mercado de las microalgas.

Este emplazamiento tiene como ventaja la posibilidad de aprovechar algunas de las instalaciones que ya forman parte del mismo; relacionadas con el proceso en concreto, como los laboratorios para la inoculación o algunas unidades para el *downstream*, o generales como los accesos, el abastecimiento eléctrico o el suministro de agua.

A continuación, la Figura 14 muestra una imagen satélite de la ubicación (36.673914, -5.819613):

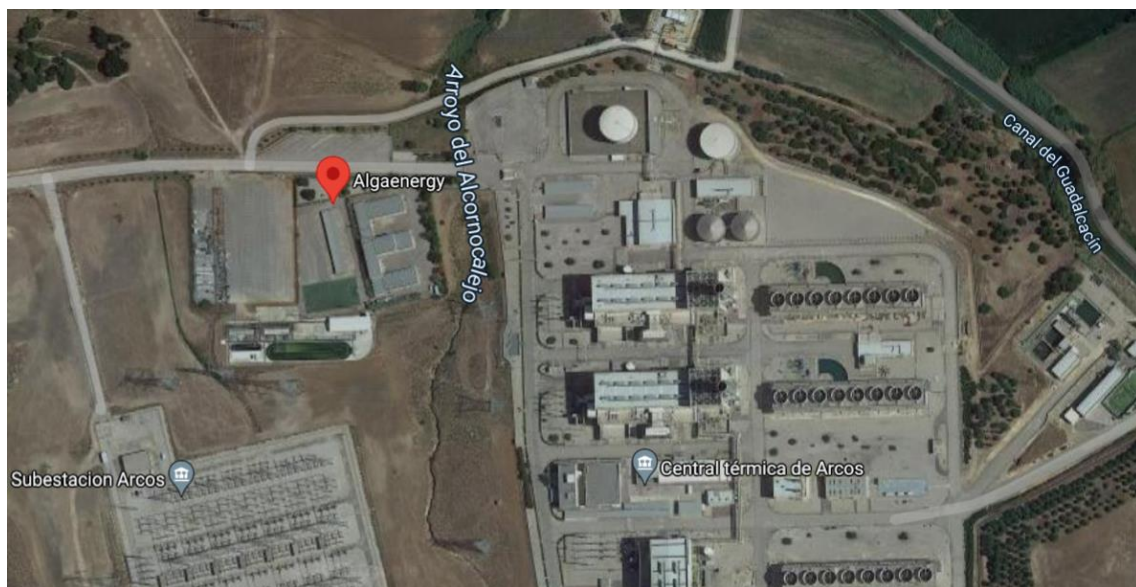


Figura 14. Imagen satélite de la ubicación propuesta para llevar a cabo el Proyecto.

9. Requisitos de diseño

El principal condicionante a la hora del diseño es que el biorreactor logre una producción anual de 50 toneladas de PUFAs por año con una concentración mínima de 5 g de PUFAs por kg de biomasa seca.

Junto con la productividad anual mencionada anteriormente, los datos cinéticos obtenidos de la bibliografía (Tabla 3) constituyen el punto de partida del diseño del proceso de producción.

Respecto a los valores de las variables operacionales derivados del estudio bibliográfico cabe destacar que se opera en condiciones estándar de presión y temperatura, es decir, que la temperatura de operación es de 25 °C y la presión de operación de 1 atm; es necesario un impulsor a 150 rpm y un caudal de aireación constante a 1 vvm. Además, las propiedades físicas del medio de cultivo se tomarán como las del agua, ya que parámetros como la densidad y viscosidad de las microalgas son similares a las de esta.

Para la elaboración del presente proyecto hay que tener en cuenta toda la normativa vigente relacionada con el mismo, afecte directa o indirectamente, como las relacionadas con los materiales y reactivos usados, o la contaminación del medio ambiente.

10. Resultados de diseño

10.1. Cálculo de la productividad

Los valores de productividad de biomasa (DX) y productividad de producto (DP) han sido calculados con la herramienta Matlab 2016® y corresponden con $18,92 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $2,84 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Este cálculo se encuentra detallado en el Anexo IV.

10.2. Cálculo de las dimensiones características del biorreactor

Partiendo de la producción anual objetivo (50 Tn de PUFAs) y la productividad calculada en el apartado anterior ($2,84 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) se calcula el volumen del reactor con la Ecuación 5, cuyo resultado es de $2,1 \text{ m}^3$. Teniendo en cuenta que este valor es bruto, ya que se tiene que llevar a cabo una extracción posterior, se aumentará el volumen hasta 5 m^3 para asegurar el cumplimiento de la producción anual objetivo.

$$V = \frac{\text{Producción anual de PUFAs} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right)}{\text{Productividad} \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3 \text{ h}} \right)} \quad (5)$$

Por cuestiones de seguridad se debe dejar libre un 25% del volumen del reactor en cabeza, así que el volumen de trabajo será de $3,75 \text{ m}^3$. La producción de DHA al año obtenida con esta capacidad es de 89,5 Tn al año, que es superior al objetivo, por tanto, se toma como adecuado trabajar con un volumen total de 5 m^3 .

Asumiendo que el biorreactor tiene forma de cilindro y una relación altura/diámetro con valor de 1,25 (valor típico para biorreactores), se calcula el diámetro interno. Todos los valores de las dimensiones características del biorreactor se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Dimensiones características del biorreactor.

H/T	1,25
Volumen total, V_r (m^3)	5
Volumen de trabajo, V_t (m^3)	3,75
Diámetro interno, T (m)	1,56

Todo el procedimiento de cálculo se encuentra pormenorizado en el Anexo V.

10.3. Diseño mecánico del biorreactor

10.3.1. Selección del material del biorreactor

Los aceros inoxidable austeníticos son los más utilizados para la fabricación de biorreactores porque son los más resistentes a la corrosión debido al elevado contenido en cromo, y a las adiciones de níquel y molibdeno.

En este caso el material seleccionado para la construcción del biorreactor de producción de aceite rico en DHA es el acero inoxidable austenítico 316L, ya que se trabaja con un medio con una concentración elevada de sal y este material soporta hasta 1,6 g de NaCl/L. Su composición y propiedades físicas se muestran en la Tabla 16 y Tabla 17.

10.3.2. Cálculo del espesor mínimo de la carcasa

El código ASME sección VIII, División I, establece que el valor mínimo que puede adoptar el espesor de la carcasa vendrá definido por el mayor obtenido de las Ecuaciones 6 y 7:

$$t_{\text{circunferencial}} = \frac{P_d \cdot R_i}{S \cdot E - 0,6 \cdot P_d} + c \quad (6)$$

$$t_{\text{longitudinal}} = \frac{P_d \cdot R_i}{2 \cdot S \cdot E - 0,4 \cdot P_d} + c \quad (7)$$

Donde:

- P_d corresponde a la presión de diseño (kg/mm^2).
- R_i corresponde al radio interno del biorreactor (mm).
- S corresponde al valor de la tensión máxima admisible (kg/mm^2).
- E corresponde a la eficiencia de la soldadura.
- c corresponde al sobre-espesor de corrosión (mm).

El valor de los parámetros necesarios para el cálculo del espesor mínimo de carcasa se muestra en la Tabla 5. Una vez realizados todos los cálculos, desarrollados con detalle en el apartado B del Anexo VI, se obtienen los siguientes resultados:

$$t_{\text{circunferencial}} = 4,48 \text{ mm}$$

$$t_{\text{longitudinal}} = 2,99 \text{ mm}$$

Tabla 5. Parámetros necesarios para el cálculo del espesor mínimo de carcasa.

P_d (kg/mm²)	0,035
R_i (mm)	781,59
S (kg/mm²)	10,8345
E	0,85
c (mm)	1,5
T_d (°C)	45

El valor del $t_{\text{circunferencial}}$ es el mayor, por tanto, este será el valor teórico del espesor de la carcasa. Para evitar fallos y accidentes se aumenta un 2%, así que el espesor mínimo de la carcasa corresponde con 5,38 mm. Consultando los valores de espesores fabricados por diversos proveedores, se ha encontrado que las planchas comercializadas con un espesor inmediatamente superior al $t_{\text{mín}}$ calculado serían de 6 mm.

Una vez conocido el valor del espesor de la carcasa, se calcula el valor del diámetro exterior de ésta haciendo uso de la Ecuación 8.

$$D_e = T + 2 \cdot t \quad (8)$$

$$D_e = 1563,19 + 2 \cdot 6 = 1575,19 \text{ mm}$$

10.3.3. Diseño de los fondos

Primero se debe seleccionar el tipo de fondo que se va a instalar en el reactor, en este caso se ha seleccionado el fondo toriesférico tipo Klopper (Figura 15), ya que es uno de los fondos más utilizados para el cultivo de microalgas heterótrofas en biorreactores de tanque agitado. Además, se cumplen los requerimientos que limitan su uso:

- Presión de diseño inferior a 7 Kg/cm².
- Temperatura de diseño inferior a 350 °C.
- Recipientes verticales con relación H/D < 10.

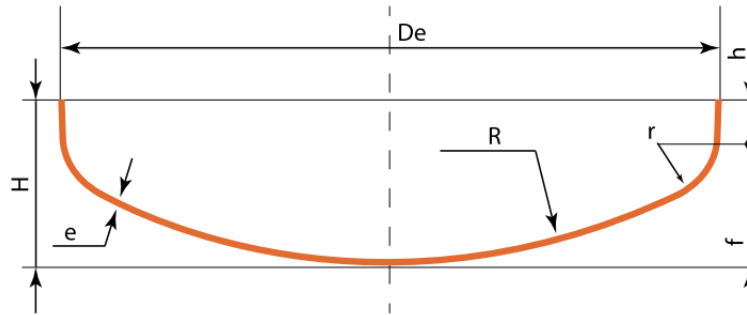


Figura 15. Esquema del fondo toriesférico tipo Klover.

Como se observa en la Tabla 7, es necesario conocer el valor del espesor para calcular los demás parámetros. El código ASME determina que el espesor mínimo del fondo Klover se calcula a partir de la Ecuación 9:

$$t_F = \frac{P_d \cdot D_e \cdot M}{2 \cdot S \cdot E - 0,2 \cdot P_d} + c \quad (9)$$

Donde:

- P_d es la presión de diseño (kg/mm^2).
- D_e es el valor del diámetro externo del biorreactor (mm).
- S es el valor de la tensión máxima admisible (kg/mm^2).
- E es la eficiencia de la soldadura.
- C es el sobre-espesor de corrosión (mm).
- M es el coeficiente que relaciona los radios de curvatura R (radio esférico interior) y r (radio de rebordo interior).

$$t_F = \frac{0,035 \cdot 1575,19 \cdot 1,54}{2 \cdot 10,8345 \cdot 0,85 - 0,2 \cdot 0,035} + 1,5 = 6,11 \text{ mm}$$

Igual que con el espesor mínimo de la carcasa, por motivos de seguridad se aumenta en un 2% el valor del espesor mínimo de los fondos, siendo finalmente de 7,33 mm. Consultando los fabricantes de fondos, se han encontrado catálogos que proporcionan todos los espesores posibles, pero en este caso teniendo en cuenta el espesor de fondo teórico, interesa que el real sea de 8 mm.

Finalmente, conocido el valor del espesor del fondo se calcula el valor de los demás parámetros para finalizar el dimensionamiento del fondo (Tabla 6). Todos los cálculos se encuentran desarrollados en el apartado C del Anexo VI.

Tabla 6. Dimensiones fondo tipo Kloppe.

Radio esférico interior R (mm)	$R = D_e$	1575,19
Radio rebordeo interior r (mm)	$r = R/10$	157,52
Espesor fondo e (mm)	$e = t_F$	8
Altura pestaña h (mm)	$h \geq 3,5 \cdot e$	28
Altura curvado f (mm)	$f = 0,1935 \cdot D_e - 0,455 \cdot e$	301,16
Altura total fondo H (mm)	$H = e + h + f$	337,16
Diámetro de disco de partida D_d (mm)	$D_d = 1,11 \cdot D_e + 1,85 \cdot h$	1800,26
Volumen útil de cabeza sin pestaña, V_f (m³)	$V_f = 0,13 \cdot T^3$	0,5

10.3.4. Diseño del agitador

El mecanismo de agitación en el interior del biorreactor fomenta la homogeneidad y evita sedimentos. Para la elección del tipo de agitador hay que tener en cuenta la viscosidad del medio, que se considerará agua, por tanto, a la temperatura de operación ($T_{op} = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) el valor de la viscosidad es 0,891 cP. Para dicho valor de viscosidad los mejores agitadores son las hélices y las turbinas.

Finalmente, se decide utilizar un agitador de turbina del tipo hojas planas y disco de 6 palas cuyas dimensiones se muestran en la Tabla 7. En el apartado D del Anexo VI se muestra pormenorizadamente todo el proceso de elección y dimensionamiento del impulsor, así como el volumen que ocupará y la potencia que consumirá.

Tabla 7. Dimensiones del agitador tipo turbina Rushton de 6 palas.

Diámetro interior del tanque, T (mm)	1563,19
Diámetro del impulsor, D (mm)	521,06
Altura del impulsor al fondo, C (mm)	521,06
Ancho de pala, h (mm)	104,21
Longitud de pala, a (mm)	130,27
Diámetro del eje central, b (mm)	104,21
Altura del líquido, H (mm)	1563,19
Diámetro del disco central, d (mm)	390,75
Inclinación palas (°)	60
Número de deflectores, n	4
Anchura de deflectores, W (mm)	156,32

El volumen total del agitador se calcula a partir de la Ecuación 10 que tiene en cuenta que está compuesto por el eje y el disco con las palas.

$$V_{agitador} = V_{turbina} + V_{eje} \quad (10)$$

$$V_{turbina} = 0,005 \text{ m}^3$$

$$V_{eje} = 0,014 \text{ m}^3$$

$$V_{agitador} = 0,005 + 0,014 = 0,019 \text{ m}^3$$

El cálculo de la potencia consumida sin tener en cuenta la aireación se realiza a partir de la Ecuación 11.

$$P = N_P \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (11)$$

$$P = 6 \cdot 997 \cdot 2,5^3 \cdot 0,521^5 = 3588,02 \text{ W} = 3,59 \text{ kW}$$

El sistema requiere un aporte de oxígeno mediante aireación, ya que la solubilidad del oxígeno en el medio de fermentación es muy baja y su demanda es alta. La potencia de agitación con aireación se calcula con la Ecuación de Michel y Miller (Ecuación 12) y el coeficiente global de transferencia de oxígeno, K_{La} , con la Ecuación de Blanch y Clark (Ecuación 13).

$$P_g = \left(\frac{P^2 \cdot N \cdot D^3}{Q_a^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (12)$$

$$P_g = \left(\frac{3588,02^2 \cdot 2,5 \cdot 0,521^3}{0,0625^{0,56}} \right)^{0,45} = 1995,28 \text{ W} = 2 \text{ kW}$$

$$K_{La} = 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} \cdot V_s^{0,7} \quad (13)$$

$$V_s = \frac{Q_a}{\text{Área}} = \frac{Q_a}{\pi \cdot \frac{D^2}{4}} = \frac{0,0625}{\pi \cdot \frac{0,521^2}{4}} = 0,29 \frac{\text{m}}{\text{s}}$$

$$K_{La} = 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{1995,28}{3,75} \right)^{0,4} \cdot 0,29^{0,7} = 0,11 \text{ s}^{-1} = 383,92 \text{ h}^{-1}$$

10.3.5. Medidas del reactor

La Tabla 8 muestra la altura y el volumen de cada parte que conforma el biorreactor. Su cálculo se encuentra detallado en el apartado E Edil Anexo VI.

Tabla 8. Medidas del biorreactor.

Volumen reactor, V_r (m^3)	5
Volumen carcasa, V_{carcasa} (m^3)	3,892
Volumen pestaña, $V_{\text{pestaña}}$ (m^3)	0,054
Volumen de cabeza sin pestaña, V_f (m^3)	0,5
Altura reactor, H_r (m)	2,63
Altura carcasa, H_{carcasa} (m)	1,95
Altura fondos, H (m)	0,34

10.3.6. Peso del reactor

El valor del peso del reactor viene dado por la Ecuación 14.

$$P_r = P_{vacío} + P_{contenido} + P_{agitador} \quad (14)$$

Los valores de cada parámetro se muestran en la Tabla 9 y su cálculo se muestra en el apartado F del Anexo VI:

Tabla 9. Pesos del reactor.

Peso vacío, $P_{vacío}$ (kg)	795,87
Peso contenido, $P_{contenido}$ (kg)	3738,75
Peso agitador, $P_{agitador}$ (kg)	151,24
Peso reactor, P_r (Tn)	4,7

10.3.7. Soporte del reactor

Una vez conocidas las dimensiones del biorreactor, al tratarse de un recipiente vertical cuyo fondo no es plano, es necesario instalar un soporte.

En este caso, el método de sujeción seleccionado son 4 patas de perfil IPN (doble T) comercial L. Los motivos de la selección se encuentran en el apartado G del Anexo VI.

10.4. Diseño del extractor de aceite

La Figura 16 muestra un esquema del proceso de extracción con flujos en contracorriente.

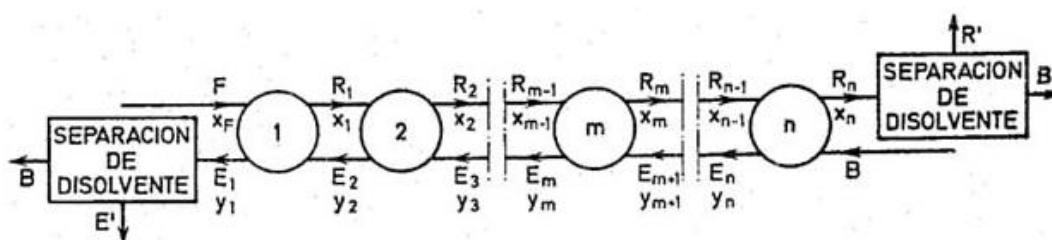


Figura 16. Disposición de flujos en el proceso de extracción.

Los balances de materia del sistema se definen en las Ecuaciones 15 y 16:

- Balance global:

$$F + B = E_1 + R_n \quad (15)$$

- Balance al soluto (S):

$$E_1 \cdot y_1 = R_n \cdot x_n = F \cdot x_F \quad (16)$$

Donde:

- F es la corriente másica de alimentación (kg/h).
- B es la corriente másica de disolvente (kg/h).
- E₁ es la corriente másica de miscela (extracto) de salida (kg/h).
- R_n es la corriente másica de sólido (refinado) de salida (kg/h).
- y₁ es la concentración másica de la corriente de miscela de salida.
- x_n es la concentración másica de la corriente de sólido de salida.
- x_F es la concentración másica de la alimentación.

Partiendo de los valores conocidos de F y x_F, y de la suposición de que el rendimiento global del aceite debe ser como mínimo de 95%, se resuelven las dos incógnitas principales: cantidad de disolvente necesaria para llevar a cabo la separación y número de etapas para ello, mediante los balances de materia definidos anteriormente junto con la curva de retención (Ecuación 17).

$$\text{Curva de retención} = cte = \frac{x_S + x_D}{x_I} = 0,3 \quad (17)$$

Se determina que son necesarias 2 etapas para que la fracción de salida de aceite residual sea igual o inferior al 5% de la que entró al extractor (Tabla 10).

Tabla 10. Balance de materia para 2 etapas ideales.

2 etapas	Parámetro	Ud	F	E ₁	R ₂	B
DHA	Caudal	kg/h	9,93	9,42	0,49	0,00
	x	%	15,00	4,93	0,67	0,00
Hexano	Caudal	kg/h	0,00	181,73	16,39	198,60
	x	%	0,00	95,07	22,41	100,00
Biomasa desaceitada	Caudal	kg/h	56,27	0,00	56,27	0,00
	x	%	85,00	0,00	76,92	0,00
Total	Caudal	kg/h	66,20	191,15	73,15	198,60

Con estos valores se calcula la producción anual de DHA que se obtendría tras la extracción, y la concentración de esta por kg de biomasa:

$$\text{Producción anual} = 9,5 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{h}} \cdot 8400 \frac{\text{h}}{\text{año}} = 79800 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{año}}$$

$$50 \frac{\text{Tn}}{\text{año}} < 79,8 \frac{\text{Tn}}{\text{año}}$$

$$Y_{P/X} = \frac{9,5 \text{ kg de DHA}}{66,2 \text{ kg de biomasa}} = 0,14 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{kg de biomasa}}$$

$$0,005 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{kg de biomasa}} < 0,14 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{kg de biomasa}}$$

Se confirma que tanto la producción anual como la concentración de DHA por kg de biomasa obtenidas superan a la fijadas como objetivo, así que el proceso se da como válido. Por último, se procede al cálculo de la longitud del extractor con la Ecuación 18:

$$L = \frac{1}{P \cdot W} \sum_{i=1}^N Q_i \quad (18)$$

Donde:

- L es la longitud efectiva del equipo (m).
- P es el ratio de percolación ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}$). Para este tipo de equipos industriales suele considerarse $4 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$.
- W es la longitud de cada etapa (m). Para este tipo de equipos industriales suele considerarse 0,6 m.
- Qi es el caudal volumétrico de la corriente (m^3/h).

$$L = \frac{1}{4 \cdot 0,6} \sum_{i=1}^2 \frac{66,2 \frac{\text{kg}}{\text{h}}}{114,64 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}} = 0,48 \text{ m}$$

Con estas condiciones, la longitud del extractor será de 0,5 metros aproximadamente.

11. Planificación

Este epígrafe muestra el proceso de materialización del objeto del Proyecto, se definen los distintos hitos llevados a cabo.

Cabe mencionar que se ha trabajado de forma intermitente debido a distintos contratiempos ocurridos en el transcurso de la redacción del presente TFG, esto ha conllevado el incumplimiento de la planificación propuesta en el Informe preliminar.

Tabla 11. Definición de los hitos a alcanzar.

Nº	Nombre	Inicio	Fin	Duración (d)	Precedente
1	Propuesta	31/10/2020	06/11/2020	7	
2	Búsqueda bibliográfica	25/01/2021	30/07/2021	187	
3	Informe preliminar	03/04/2021	07/04/2021	5	1, 2
4	Informe intermedio	08/05/2021	14/05/2021	7	3
5	Revisión bibliográfica	25/01/2021	30/07/2021	187	2
6	Modelo matemático	08/02/2021	30/07/2021	173	2
7	Memoria	08/02/2021	08/09/2021	213	5, 6
8	Anexos	03/05/2021	08/09/2021	129	7
9	Planos	09/09/2021	09/09/2021	1	7, 8
10	Pliego de condiciones	04/09/2021	07/09/2021	4	7,8
11	Presupuesto	09/09/2021	10/09/2021	2	10
12	Repaso y correcciones	11/09/2021	13/09/2021	3	7,8,9,10,11
13	Entrega	13/09/2021	13/09/2021	1	12
14	Presentación	14/09/2021	20/09/2021	7	13
15	Defensa	20/09/2021	20/09/2021	1	14

A continuación, en la Figura 17 se muestra un diagrama de Gantt según la planificación indicada en la Tabla 11.

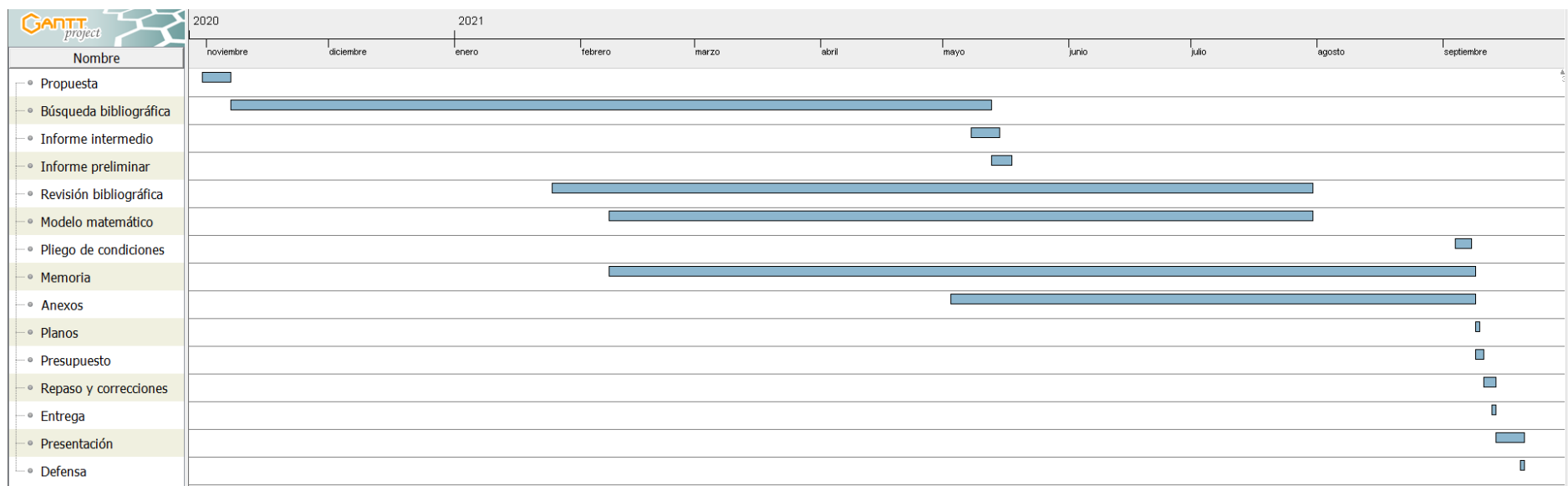


Figura 17. Diagrama de Gantt del Proyecto.

12. Normas y referencias

La bibliografía y webgrafía empleada ha sido:

- Abad, S., & Turon, X. (2015). Biotechnological production of docosahexaenoic acid using *Aurantiochytrium limacinum*: Carbon sources comparison and growth characterization. *Marine Drugs*, 13(12), 7275–7284. <https://doi.org/10.3390/md13127064>
- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>
- Belda Ferrin, A. (2013). *Diseño de un reactor químico para la fabricación de 9000 toneladas anuales de resina de poliuretano*. 01(4), 1–122.
- Behrens, P. W., & Kyle, D. J. (1996). Microalgae as a source of fatty acids. En *Journal of Food Lipids* (Vol. 3, págs. 259-272). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.1996.tb00073.x>
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., & Kovar, K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: Achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(1), 31–46. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3311-6>
- Callister, W. (2016). CALLISTER_-_Ciencia_e_Ingenieria_de_los_Materiales.pdf. In *Ciencia e Ingeniería de Materiales* (9ª, pp. 432–459). Reverté.
- Castillo, V. (2013). Diseño y Calculo de un Agitador de Fluidos. In *Facultad de Ingeniería Departamento de Ingeniería mecánica*. http://repobib.ubiobio.cl/jspui/bitstream/123456789/412/1/Castillo_Uribe_Vladimir.pdf
- Couto, R. M., Simões, P. C., Reis, A., da Silva, T. L., Martins, V. H., & Sánchez-Vicente, Y. (2010). Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. *Engineering in Life Sciences*, 10(2), 158–164. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900074>
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190–209. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>
- da Silva, T. L., Mendes, A., Mendes, R. L., Calado, V., Alves, S. S., Vasconcelos, J. M. T., & Reis, A. (2006). Effect of n-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 408–416. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0081-8>
- da Silva, T., & Reis, A. (2015). Scale-up Problems for the Large Scale Production of Algae. En *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* (págs. 125-149). Springer, Cham. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_6
- da Silva, T. L., Moniz, P., Silva, C., & Reis, A. (2019). The dark side of microalgae biotechnology: A heterotrophic biorefinery platform directed to ω -3 rich lipid production. *Microorganisms*, 7(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120670>
- de Swaaf, M. E., de Rijk, T. C., Eggink, G., & Sijtsma, L. (1999). Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80111-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80111-8)
- de Swaaf, M. E., de Rijk, T. C., van Der Meer, P., Eggink, G., & Sijtsma, L. (2003). Analysis of

- docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. *Journal of Biotechnology*, 103(1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00070-1)
- Diao, J., Li, X., Pei, G., Liu, L., & Chen, L. (2018). Comparative metabolomic analysis of *Cryptocodinium cohnii* in response to different dissolved oxygen levels during docosahexaenoic acid fermentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), 941–947. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.024>
- Durán García, M. E., & Ruiz Navas, R. A. (2015). Diseño de equipos de contacto sólido-líquido a elevadas presiones en el procesamiento de la biomasa. *Ciencia y Tecnología*, 1(15), 25–40. <https://doi.org/10.18682/cyt.v1i15.310>
- estrucplan. (30 de Noviembre de 2012). Obtenido de Cálculo de Recipientes a Presión: <https://estrucplan.com.ar/calculo-de-recipientes-a-presion/>
- Expósito, R. (2013). *Diseño preliminar de una planta de extracción de oleorresina de licopeno*. Universidad de Almería.
- Fondayur. (s.f.). Obtenido de Fondo Kloppe (DIN-28011): <https://fondayur.com/fondos/fondo-kloppe-din-28011/>
- Ganuja, E., Anderson, A. J., & Ratledge, C. (2008). High-cell-density cultivation of *Schizochytrium sp.* in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1559–1564. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9723-4>
- Gómez, F., Moreira, D., & López-García, P. (2011). Advances on the study of dinoflagellates (Dinophyceae) with the molecular phylogeny. *Hidrobiologica*, 21(3), 343–364.
- Gong, Y., Liu, J., Jiang, M., Liang, Z., Jin, H., Hu, X., Wan, X., & Hu, C. (2015). Improvement of Omega-3 Docosahexaenoic Acid Production by Marine Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Using Rapeseed Meal Hydrolysate and Waste Molasses as Feedstock. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125368>
- Guo, D. S., Ji, X. J., Ren, L. J., Yin, F. W., Sun, X. M., Huang, H., & Zhen, G. (2018). Development of a multi-stage continuous fermentation strategy for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.* *Bioresource Technology*, 269(August), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.066>
- Hillig, F., Pilarek, M., Junne, S., & Neubauer, P. (2014). Cultivation of marine microorganisms in single-use systems. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 138, 179–206. https://doi.org/10.1007/10_2013_219
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
- iCrowd Newswire . (13 de Abril de 2021). Obtenido de IndustryARC: <https://www.icrowdsp.com/2021/04/13/se-estima-que-el-tamano-del-mercado-de-pufa-omega-3-de-la-epa-y-el-dha-alcanzara-los-4-470-millones-de-dolares-en-2025/>
- INEVID. (2014). Obtenido de Fondos y cabezales de recipientes en la industria petroquímica: <https://inevid.blogspot.com/2014/07/Fondos-y-cabezales-de-recipiente-en-la-industria-petroquimica.html>
- Jiang, Y., & Chen, F. (2000). Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. *Process Biochemistry*, 35(10), 1205–1209. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00163-1)

- Kyle, D. (1994). *Estados Unidos Patente* nº 5.374.657.
- Liu, L., Wang, F., Pei, G., Cui, J., Diao, J., Lv, M., Chen, L., & Zhang, W. (2020). Repeated fed-batch strategy and metabolomic analysis to achieve high docosahexaenoic acid productivity in *Cryptocodinium cohnii*. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01349-6>
- Mansour, M. P. (2005). Reversed-phase high-performance liquid chromatography purification of methyl esters of C16-C28 polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctanoic acid [28:8(n-3)]. *Journal of Chromatography A*, 1097(1–2), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.011>
- Marques, I. P., Batista, A. P., Coelho, A., & Lopes da Silva, T. (2018). Co-digestion of *Rhodospiridium toruloides* biorefinery wastes for biogas production. *Process Biochemistry*, 64(September 2017), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.023>
- Mendes, A., da Silva, T. L., & Reis, A. (2007). DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation. *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), 38–44.
- Mendes, A., Guerra, P., Madeira, V., Ruano, F., Lopes da Silva, T., & Reis, A. (2007). Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1209–1215. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9349-z>
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in Microbiology*, 7(10). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01539>
- Patel, A., Matsakas, L., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2018). Heterotrophic cultivation of *Auxenochlorella protothecoides* using forest biomass as a feedstock for sustainable biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1173-1>
- Peiris, S. E., de Silva, E. D. U. D., Edussuriya, M., Attanayake, A. M. U. R. K., & Peiris, B. C. N. (2012). CSUP technique: A low cost sterilization method using sodium hypochlorite to replace the use of expensive equipment in micropropagation. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 40(1), 49–54. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v40i1.4168>
- Pellicer, M. T., Abad, S., Planas, A., & Turon, X. (2018). *Procedimiento para la producción de DHA* (Patent No. 2617081). <https://patents.google.com/patent/ES2617081B1/es>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., & Lin, C. S. K. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*, 137, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.088>
- Rumiani, L. A., Jalili, H., & Amrane, A. (2018). Enhanced docosahexaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* under combined stress in two-stage cultivation with date syrup based medium. *Algal Research*, 34(July), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.010>
- Salem Jr, N., & Eggersdorfer, M. (2015). Is the world supply of omega-3 fatty acids adequate for optimal human nutrition? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18, 147–54. doi:10.1097/MCO.0000000000000145

- Safdar, W., Shamooun, M., Zan, X., Haider, J., Sharif, H. R., Shoaib, M., & Song, Y. (2017). Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii* under different nitrogen source and concentration. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0384-3>
- Safdar, W., Zan, X., Shamooun, M., Sharif, H. R., Mukama, O., Tang, X., & Song, Y. (2017). Effects of twenty standard amino acids on biochemical constituents, docosahexaenoic acid production and metabolic activity changes of *Cryptocodinium cohnii*. *Bioresource Technology*, 238, 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.024>
- Song, P., Kuryatov, A., & Axelsen, P. H. (2020). A new synthetic medium for the optimization of docosahexaenoic acid production in *Cryptocodinium cohnii*. *PLoS ONE*, 15(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229556>
- Sun, X. M., Ren, L. J., Bi, Z. Q., Ji, X. J., Zhao, Q. Y., Jiang, L., & Huang, H. (2018). Development of a cooperative two-factor adaptive-evolution method to enhance lipid production and prevent lipid peroxidation in *Schizochytrium sp.* *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1065-4>
- Valdivieso, M. (2012). Producción de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados por fermentación. *Tecnifood*(82). Obtenido de <https://techpress.es/produccion-de-aceites-ricos-en-acidos-grasos-poliinsaturados-por-fermentacion/>
- van der Voort, M. P. J., Spruijt, J., Potters, J., de Wolf, P. L., & Elissen, H. J. H. (2017). Socio-economic assessment of Algae-based PUFA production. *Public Output Report of the PUFACHain Project*, 613303, 79. www.pufachain.eu
- Vonshak, A. (1990). Recent advances in microalgal biotechnology. In *Biotechnology Advances* (Vol. 8, Issue 4, pp. 709–727). OMICS Group eBooks. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(90\)91993-Q](https://doi.org/10.1016/0734-9750(90)91993-Q)
- Wang, C., & Lan, C. Q. (2018). Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 986–1002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.001>
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627–3652. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>
- Wu, S. T., Yu, S. T., & Lin, L. P. (2005). Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium sp.* S31. *Process Biochemistry*, 40(9), 3103–3108. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.007>
- Zhu, L., Zhang, X., Ji, L., Song, X., & Kuang, C. (2007). Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochemistry*, 42(2), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.08.002>

La normativa básica que se ha tenido en cuenta ha sido:

- Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.
- Ley 34/2007, de 15 de noviembre, de calidad del aire y protección de la atmósfera.
- Decreto Legislativo 1/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de prevención y control integrados de la contaminación.

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 2060/2008, de 12 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de equipos a presión y sus instrucciones técnicas complementarias.
- Real Decreto 815/2013, de 18 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación.
- Real Decreto 634/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba el Reglamento del Impuesto sobre Sociedades.
- Ley 27/2014, de 27 de noviembre, del Impuesto de Sociedades.

Los programas empleados para la redacción de la memoria han sido:

- Microsoft Word 2016: procesador de textos.
- Microsoft Excel 2016: construcción de gráficas.
- Matlab 2016: simulaciones del proceso.
- EdrawMax: elaboración de los diagramas de proceso.

Documento II: Anexos

Índice

Anexo I. Elección de la especie de microalga heterótrofa	69
A) <i>Cryptocodinium cohnii</i>	72
B) <i>Aurantiochytrium limacinum</i>	74
C) Gráficos conjuntos	75
Anexo II. Modelo matemático. Cinética del proceso	77
A) Scripts para la configuración de 2 RCTA en serie	79
B) Scripts para la configuración de 2 RCTA en serie, alimentando el segundo con una corriente fuente de carbono.....	83
C) Scripts para la configuración de 1 RCTA.....	87
Anexo III. Condiciones de cultivo	91
Anexo IV. Cálculo de la productividad.....	94
Anexo V. Cálculo de las dimensiones características del biorreactor.....	95
Anexo VI. Diseño mecánico del biorreactor	97
A) Selección del material del biorreactor	97
B) Cálculo del espesor mínimo de la carcasa.....	97
C) Diseño de los fondos	103
D) Selección y diseño del agitador.....	106
E) Medidas reales del biorreactor.....	112
F) Peso del biorreactor	113
G) Soporte del biorreactor.....	114
H) Prueba hidráulica.....	115
Anexo VII. Diseño del extractor de aceite	116
Anexo VIII. Estudio de seguridad y salud en la obra	121
1. Objeto de estudio.....	121
2. Descripción y emplazamiento de la obra	121
3. Instalaciones provisionales y asistencia sanitaria.....	121
4. Maquinaria de obra.....	122
5. Medios auxiliares	123
6. Riesgos laborales evitables.....	123
7. Riesgos laborales no evitables.....	124
8. Riesgos laborales especiales.....	130
9. Medidas de prevención especiales para el coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19).....	130
10. Libro de incidencias	131
11. Paralización de los trabajos	132
12. Normativa de seguridad e higiene aplicada a la obra.....	132
Anexo IX. Estudio de seguridad en las unidades	134
1. Instrumentos de seguridad.....	134

2. Dispositivos de alivio de presión	134
3. Análisis de peligros y operabilidad (HAZOP)	134

Anexo I. Elección de la especie de microalga heterótrofa

Obtener parámetros cinéticos que caractericen la producción industrial de aceites ricos en PUFAs omega-3 a partir de microalgas heterótrofas no es fácil, puesto que se trata de un proceso novedoso que aún está en estudio y las empresas mantienen sus investigaciones como secretos industriales.

En la literatura se han encontrado los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 12 para las dos posibles especies de microalgas heterótrofas seleccionadas como las más adecuadas (*Cryptocodinium cohnii* y *Aurantiochytrium limacinum*). Con estos datos y haciendo uso de la herramienta Matlab 2016® se ha simulado el proceso con el fin de elegir la mejor especie de microalga.

Tabla 12. Parámetros cinéticos en batch de *C. cohnii* y *A. limacinum* para la producción de aceite rico en DHA.

Organismo	Fuente de carbono	μ_{\max} (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g/g)	K_s (g/L)	α (g/g)	Referencias
<i>C. cohnii</i>	Glucosa	0,120	0,60	3,00*	0,050*	(Jiang & Chen, 2000)
<i>A. limacinum</i>	Glucosa	0,180	0,84	2,50	0,150*	(Abad & Turon, 2015)

* Calculado a partir de los datos de la bibliografía.

Para llevar a cabo la implementación hay que considerar que se trabaja en discontinuo (batch) y el crecimiento celular se describe por el modelo de Monod, cuyo sistema está compuesto por las siguientes ecuaciones diferenciales ordinarias:

Para el crecimiento de la biomasa:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{siendo} \quad \mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

Para el consumo de sustrato:

$$\frac{dS}{dt} = -q_S \cdot X \quad \text{siendo} \quad q_S = \frac{\mu}{Y'_{X/S}} + m_S$$

Para la formación de producto:

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X \quad \text{siendo} \quad q_P = \alpha\mu + \beta$$

Donde:

- t es el tiempo (h)
- X es la concentración de biomasa (g/L)
- μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
- $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1})
- S es la concentración de la fuente de carbono (g/L)
- K_S es la constante de saturación (g/L)
- q_S es la velocidad específica de consumo de fuente de carbono (g/g h)
- $Y'_{X/S}$ es el factor de rendimiento biomasa fuente de carbono (g/g)
- m_S es el coeficiente de mantenimiento de células (g/g h)
- P es la concentración de producto (g/L)
- q_P es la velocidad específica de formación de producto (g/g h)
- α es la constante de formación de producto asociada al crecimiento (g/g)
- β es la constante de formación de producto no asociada al crecimiento (g/g h)

A continuación, se presentan los scripts creados en Matlab 2016® para la obtención de las distintas simulaciones:

A) *Cryptocodinium cohnii*

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

```
%-----CONSTANTES-----  
  
mumax=0.12; %Velocidad especifica máxima de crecimiento (h-1)  
ks=3; %Constante de saturación (g/L)
```

```
Y0xs=0.6; % Factor de rendimiento biomasa sustrato (g biomasa/g  
sustrato)  
ms=0; % Coeficiente de mantenimiento de células (g sustrato/g  
biomasa/h)  
alfa=0.05; %Coeficiente de formación de producto asociado al  
crecimiento (g producto/g biomasa)  
beta1=0; %Coeficiente de formación de producto no asociado al  
crecimiento (g producto/g biomasa/h)  
  
ts=0; %Tiempo inicial (h)  
tf=100; %Tiempo final (h)  
X0=0.63; %Concentración de biomasa inicial (g/L)  
S0=20; %Concentración de sustrato inicial (g/L)  
P0=0; %Concentración de producto inicial (g/L)  
n=20; %Número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=funC(t,y) %Variación de todas las variables respecto al  
tiempo  
constantesC;  
  
%Formulación de variables  
XC=y(1); SC=y(2); PC=y(3);  
  
%Ecuaciones del sistema  
mu=mumax*SC/(ks+SC);  
qs=mu/Y0xs+ms;  
qp=alfa*mu+beta1;  
  
%Sistema de Ecuaciones diferenciales  
dXdt=mu*XC;  
dSdt=-qs*XC;  
dPdt=qp*XC;  
dydt=[dXdt;dSdt;dPdt];  
end
```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```
%-----ODE-----  
  
constantesC;  
tspan=[ts tf];  
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6); %Adaptación del error  
y0=[X0 S0 P0]; %Matriz de valores iniciales  
[tm,ym]=ode45(@funC,tspan,y0,options); %Comando según necesidades  
%Para no trabajar con todos los datos obtenidos, se definen vectores  
adaptados a lo que queremos  
t_n=linspace(ts,tf,n); %Intervalo de tiempo para trabajar  
y_n=interp1(tm,ym,t_n,'spline'); %Intervalo de concentración para  
trabajar  
XCsim=y_n(:,1); SCsim=y_n(:,2); PCsim=y_n(:,3); %Matriz para cada  
variable  
Valores_finales=y_n(end,:) %Matriz valores finales  
musimC=mumax*SCsim./(ks+SCsim);
```

```
%-----DATOS-----  
Resultados=[t_n',XCsim,SCsim,PCsim];
```

B) *Aurantiochytrium limacinum*

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

```
%-----CONSTANTES-----  
  
mumax=0.18; %Velocidad específica máxima de crecimiento (h-1)  
ks=2.5; %Constante de saturación (g/L)  
Y0xs=0.84; % Factor de rendimiento biomasa sustrato (g biomasa/g  
sustrato)  
ms=0; % Coeficiente de mantenimiento de células (g sustrato/g  
biomasa/h)  
alfa=0.15; %Coeficiente de formación de producto asociado al  
crecimiento (g producto/g biomasa)  
beta1=0; %Coeficiente de formación de producto no asociado al  
crecimiento (g producto/g biomasa/h)  
  
ts=0; %Tiempo inicial (h)  
tf=100; %Tiempo final (h)  
X0=0.63; %Concentración de biomasa inicial (g/L)  
S0=20; %Concentración de sustrato inicial (g/L)  
P0=0; %Concentración de producto inicial (g/L)  
n=20; %Número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=funA(t,y) %Variación de todas las variables respecto al  
tiempo  
constantesA;  
  
%Formulación de variables  
XA=y(1); SA=y(2); PA=y(3);  
  
%Ecuaciones del sistema  
mu=mumax*SA/(ks+SA);  
qs=mu/Y0xs+ms;  
qp=alfa*mu+beta1;  
  
%Sistema de Ecuaciones diferenciales  
dXdT=mu*XA;  
dSdT=-qs*XA;  
dPdT=qp*XA;  
dydt=[dXdT;dSdT;dPdT];  
end
```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```
%-----ODE-----

constantesA;
tspan=[ts tf];
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6); %Adaptación del error
y0=[X0 S0 P0]; %Matriz de valores iniciales
[tm,ym]=ode45(@funA,tspan,y0,options); %Comando según necesidades
%Para no trabajar con todos los datos obtenidos, se definen vectores
adaptados a lo que queremos
t_n=linspace(ts,tf,n); %Intervalo de tiempo para trabajar
y_n=interp1(tm,ym,t_n,'spline'); %Intervalo de concentración para
trabajar
XAsim=y_n(:,1);SAsim=y_n(:,2);PAsim=y_n(:,3); %Matriz para cada
variable
Valores_finales=y_n(end,:) %Matriz valores finales
musimA=mumax*SAsim./(ks+SAsim);

%-----DATOS-----

Resultados=[t_n',XAsim,SAsim,PAsim];
```

C) Gráficos conjuntos

```
constantesC;
modelC;
constantesA;
modelA;

%-----GRÁFICOS-----

figure(1)
plot(t_n,XCsim,t_n,XAsim,'linewidth',3);
xlabel('tiempo,horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('Biomasa,g/L','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('C. cohnii','A. limacinum ')
hold on

figure(2)
plot(t_n,SCsim,t_n,SAsim,'linewidth',3);
xlabel('tiempo,horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('Sustrato,g/L','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('C. cohnii','A. limacinum ')
hold on

figure(3)
plot(t_n,PCsim,t_n,PAsim,'linewidth',3);
xlabel('tiempo,horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('Producto,g/L','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('C. cohnii','A. limacinum ')
hold on

figure(4)
plot(t_n,musimC,t_n,musimA,'linewidth',3);
xlabel('tiempo,horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('mu,h-1','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('C. cohnii','A. limacinum ')
hold on
```

Una vez ejecutados los scripts con las consideraciones adecuadas, se obtienen las gráficas de la Figura 18.

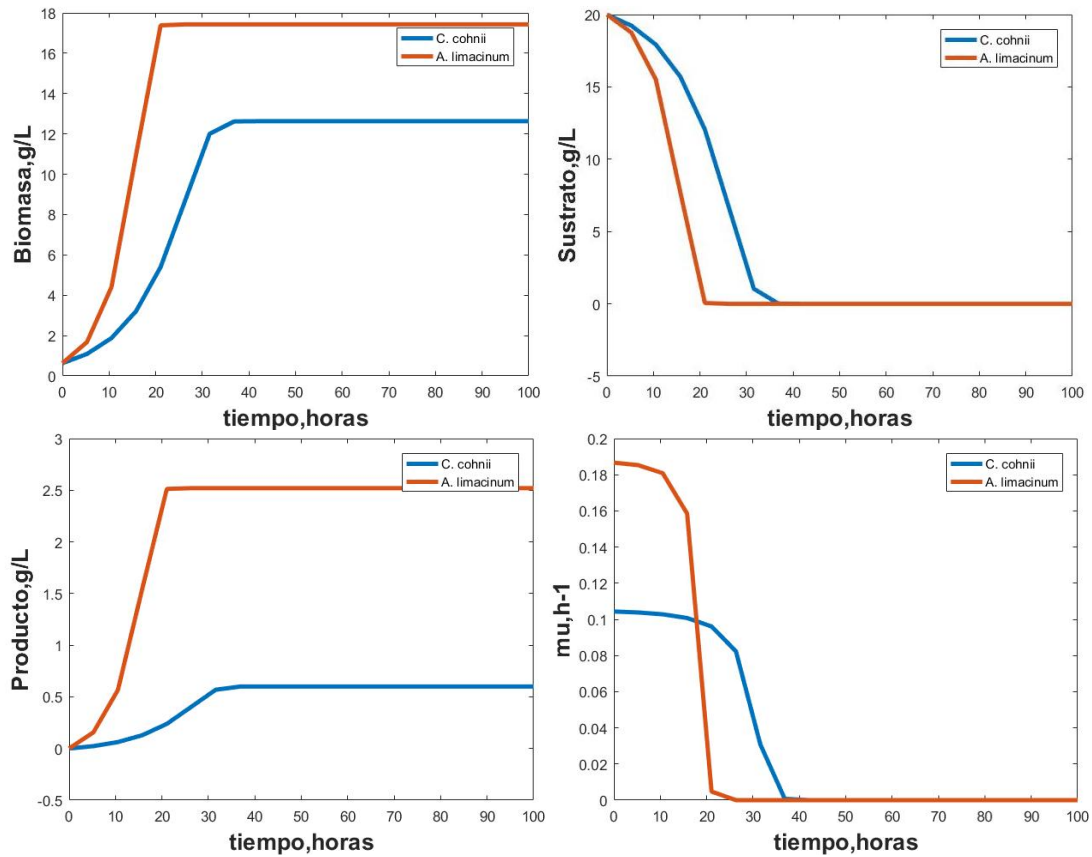


Figura 18. Evolución de la biomasa, el sustrato, el producto y la velocidad específica de crecimiento (μ) de *Cryptocodinium cohnii* y *Aurantiochytrium limacinum* operando en batch con las mismas condiciones iniciales.

Teniendo en cuenta las distintas simulaciones, la especie que presenta mejores resultados y, por tanto, es la seleccionada para el presente proyecto corresponde con *Aurantiochytrium limacinum*.

Anexo II. Modelo matemático. Cinética del proceso

La configuración de trabajo inicial consiste en dos reactores continuos de tanque agitado en serie, por lo que las ecuaciones que definen el sistema, teniendo en cuenta que la cinética microbiana se describe por el modelo de Monod, son las siguientes:

Para el crecimiento de la biomasa:

$$\frac{dX_1}{dt} = (\mu_1 - D_1) \cdot X_1 \quad \text{siendo} \quad \mu_1 = \mu_{máx1} \frac{S_1}{K_{S1} + S_1}$$

$$\frac{dX_2}{dt} = D_2 \cdot (X_1 - X_2) + \mu_2 \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad \mu_2 = \mu_{máx2} \frac{S_2}{K_{S2} + S_2}$$

Para el consumo de la fuente de carbono:

$$\frac{dS_1}{dt} = D_1 \cdot (S_{e1} - S_1) - q_{S1} \cdot X_1 \quad \text{siendo} \quad q_{S1} = \frac{\mu_1}{Y'_{X/S1}} + m_{S1}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = D_2 \cdot (S_1 - S_2) - q_{S2} \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad q_{S2} = \frac{\mu_2}{Y'_{X/S2}} + m_{S2}$$

Para el consumo de la fuente de nitrógeno:

$$\frac{dN_1}{dt} = D_1 \cdot (N_{01} - N_1) - q_{N1} \cdot X_1 \quad \text{siendo} \quad q_{N1} = \frac{\mu_1}{Y'_{X/N1}} + m_{N1}$$

$$\frac{dN_2}{dt} = D_2 \cdot (N_1 - N_2) - q_{N2} \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad q_{N2} = \frac{\mu_2}{Y'_{X/N2}} + m_{N2}$$

Para la formación de producto:

$$\frac{dP_1}{dt} = q_{P1} \cdot X_1 - D_1 \cdot P_1 \quad \text{siendo} \quad q_{P1} = \alpha_1 \mu_1 + \beta_1$$

$$\frac{dP_2}{dt} = D_2 \cdot (P_1 - P_2) + q_{P2} \cdot X_2 \quad \text{siendo} \quad q_{P2} = \alpha_2 \mu_2 + \beta_2$$

Tasas de dilución:

$$D_1 = \frac{V_1}{Q_1}$$

$$D_2 = \frac{V_2}{Q_2}$$

Donde:

- t es el tiempo (h)
- X_i es la concentración de biomasa (g/L)
- μ_i es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
- $\mu_{máx i}$ es la velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1})
- S_i es la concentración de la fuente de carbono (g/L)
- $K_{S i}$ es la constante de saturación (g/L)
- $q_{S i}$ es la velocidad específica de consumo de fuente de carbono (g/g h)
- $Y'_{X/S i}$ es el factor de rendimiento biomasa fuente de carbono (g/g)
- $m_{S i}$ es el coeficiente de mantenimiento de células (g/g h)
- N_i es la concentración de la fuente de nitrógeno (g/L)
- $q_{N i}$ es la velocidad específica de consumo de fuente de nitrógeno (g/g h)
- $Y'_{X/N i}$ es el factor de rendimiento biomasa fuente de nitrógeno (g/g)
- $m_{N i}$ es el coeficiente de mantenimiento de células (g/g h)
- P_i es la concentración de producto (g/L)
- $q_{P i}$ es la velocidad específica de formación de producto (g/g h)
- α_i es la constante de formación de producto asociada al crecimiento (g/g)
- β_i es la constante de formación de producto no asociada al crecimiento (g/g h)
- D_i es la tasa de dilución (h^{-1})

Los subíndices 1 y 2 hacen referencia al RTA 1 y RTA 2 respectivamente.

Los parámetros cinéticos característicos del proceso mostrados en la Tabla 13 se han obtenido de la literatura (Abad & Turon, 2015). Conocidos dichos valores y las ecuaciones que definen el sistema se realiza la simulación del proceso con la herramienta Matlab 2016®.

Tabla 13. Parámetros cinéticos característicos del proceso.

$\mu_{\text{máx}} = 0,18 \text{ h}^{-1}$
$K_S = 2,5 \text{ kg/m}^3$
$K_N = 0,01 \text{ kg/m}^3$
$Y_{X/S} = 0,84 \text{ kg/kg}$
$m_S = 0 \text{ kg/kg}$
$Y_{X/N} = 4 \text{ kg/kg}$
$m_N = 0 \text{ kg/kg}$
$\alpha = 0,15 \text{ kg/kg}$
$\beta = 0 \text{ kg/kg h}$

A) Scripts para la configuración de 2 RCTA en serie

- RTA 1

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

```
%-----CONSTANTES-----

mumax1=0.18; % Velocidad especifica máxima de crecimiento RTA1 (h-1)
ks1=2.5;     % Constante de saturación RTA1 (kg/m3)
kn1=0.01;    % Constante
Y0xs1=0.84;  % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA1 (kg
biomasa/kg fuente de carbono)
ms1=0;      % Coeficiente de mantenimiento de células RTA1 (kg fuente
de carbono/kg biomasa/h)
Y0xn1=4;     % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA1 (kg
biomasa/kg fuente de nitrógeno)
mn1=0;      % Coeficiente de mantenimiento de células RTA1 (kg fuente
de nitrógeno/kg biomasa/h)
alfa1=0.15;  % Coeficiente de formación de producto asociado al
crecimiento RTA1 (kg producto/kg biomasa)
beta1=0;     % Coeficiente de formación de producto no asociado al
crecimiento RTA1 (kg producto/kg biomasa/h)

% -----CONDICIONES INICIALES-----

ts1=0;       % Tiempo inicial RTA1 (h)
tf1=1000;    % Tiempo final RTA1 (h)
D1=0.165;    % Factor de dilución RTA1 (Q/V1, h-1)
```

```
X01=0.63;      % Concentración de biomasa inicial RTA1(kg/m3)
S01=0;        % Concentración de fuente de carbono inicial RTA1 (kg/m3)
Se1=165;      % Concentración de fuente de carbono en la alimentación
RTA1(kg/m3)
Ne1=32;       % Concentración de nitrógeno a la entrada
N01=0;        % Concentración de fuente de nitrógeno inicial RTA1
(kg/m3)
P01=0;        % Concentración de producto inicial RTA1 (kg/m3)

% Las condiciones iniciales del RTA2 son las finales del RTA2

n=100;        % número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=fun(t,y)
constantes;

%Formulación de variables
X1=y(1); S1=y(2); N1=y(3); P1=y(4);

%Ecuaciones del sistema
mul=mumax1*S1/(ks1+S1)*N1/(kn1+N1);
qs1=mul/Y0xs1+ms1;
qn1=mul/Y0xn1+mn1;
qp1=alfa1*mul+beta1;

%Sistema de Ecuaciones diferenciales
dX1dt=(mul-D1)*X1;
dS1dt=D1*(Se1-S1)-qs1*X1;
dN1dt=D1*(Ne1-N1)-qn1*X1;
dP1dt=qp1*X1-D1*P1;

dydt=[dX1dt; dS1dt; dN1dt; dP1dt];
end
```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```
%-----ODE-----

constantes
tspan1=[ts1 tf1];
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);
y0=[X01 S01 N01 P01];
[tm1,ym1]=ode15s(@fun,tspan1,y0,options);
t_n1=linspace(ts1,tf1,n);          % n puntos de tiempo para
mostrar
y_n1=interp1(tm1,ym1,t_n1,'spline'); % n valores de concentración
para mostrar
Xsim1=y_n1(:,1);Ssim1=y_n1(:,2);Nsim1=y_n1(:,3);Psim1=y_n1(:,4);
Valores_finales1=y_n1(end,:)
```

```
%-----GRAFICOS-----

figure(1)
plot(t_n1,Xsim1,t_n1,Ssim1,t_n1,Psim1,t_n1,Nsim1,'linewidth',3);
title('RTA 1','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('X, S, N, P, kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('X','S','P','N')
hold on

% Datos
resultados1=[t_n1,Xsim1,Ssim1,Nsim1,Psim1,];
```

- RTA 2

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

```
%-----CONSTANTES-----

mumax2=0.18; % Velocidad especifica máxima de crecimiento RTA2 (h-1)
kn2=0.01;    % Constante
ks2=2.5;     % Constante de saturación RTA2 (kg/m3)
Y0xs2=0.84;  % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA2 (kg
biomasa/kg fuente de carbono)
ms2=0;       % Coeficiente de mantenimiento de células RTA2 (kg fuente
de carbono/kg biomasa/h)
Y0xn2=4;     % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA2 (kg
biomasa/kg fuente de nitrógeno)
mn2=0;       % Coeficiente de mantenimiento de células RTA2 (kg fuente
de nitrógeno/kg biomasa/h)
alfa2=0.15;  % Coeficiente de formación de producto asociado al
crecimiento RTA2 (kg producto/kg biomasa)
beta2=0;     % Coeficiente de formación de producto no asociado al
crecimiento RTA2 (kg producto/kg biomasa/h)

% -----CONDICIONES INICIALES-----

ts2=0;       % Tiempo inicial RTA2 (h)
tf2=1000;    % Tiempo final RTA2 (h)
D2=0.165;    % Factor de dilución RTA2 (Q/V2, h-1)

X02=114.6417; % Concentración de biomasa inicial RTA2(kg/m3)
S02=28.5218;  % Concentración de fuente de carbono inicial RTA2
(kg/m3)
N02=3.3396;   % Concentración de fuente de nitrógeno inicial RTA2
(kg/m3)
P02=17.1963;  % Concentración de producto inicial RTA2 (kg/m3)

Xe2=X02;      % Concentración de biomasa en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
Se2=S02;      % Concentración de fuente de carbono en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
Ne2=N02;      % Concentración de fuente de nitrógeno en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
Pe2=P02;      % Concentración de producto en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
```

```
% Las condiciones iniciales del RTA2 son las finales del RTA2  
n=100;          % número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=fun(t,y)  
constantes;  
  
%Formulación de variables  
X2=y(1); S2=y(2); N2=y(3); P2=y(4);  
  
%Ecuaciones del sistema  
mu2=mumax2*S2/(ks2+S2)*N2/(kn2+N2);  
qs2=mu2/Y0xs2+ms2;  
qn2=mu2/Y0xn2+mn2;  
qp2=alfa2*mu2+beta2;  
  
%Sistema de Ecuaciones diferenciales  
dX2dt=D2*(Xe2-X2)+mu2*X2;  
dS2dt=D2*(Se2-S2)-qs2*X2;  
dN2dt=D2*(Ne2-N2)-qn2*X2;  
dP2dt=D2*(Pe2-P2)+qp2*X2;  
  
dydt=[dX2dt; dS2dt; dN2dt; dP2dt;];  
end
```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```
%-----ODE-----  
  
constantes  
tspan2=[ts2 tf2];  
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);  
y0=[X02 S02 N02 P02];  
[tm2,ym2]=ode15s(@fun,tspan2,y0,options);  
t_n2=linspace(ts2,tf2,n);          % n puntos de tiempo para  
mostrar  
y_n2=interp1(tm2,ym2,t_n2,'spline'); % n valores de concentración  
para mostrar  
Xsim2=y_n2(:,1);Ssim2=y_n2(:,2);Nsim2=y_n2(:,3);Psim2=y_n2(:,4);  
Valores_finales2=y_n2(end,:)  
  
figure(1)  
plot(t_n2,Xsim2,t_n2,Ssim2,t_n2,Psim2,t_n2,Nsim2,'linewidth',3);  
title('RTA 2','FontSize',16,'FontWeight','bold')  
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')  
ylabel('X, S, N, P, kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')  
legend('X','S','P','N')  
hold on  
  
% Datos  
resultados2=[t_n2',Xsim2,Ssim2,Nsim2,Psim2];
```

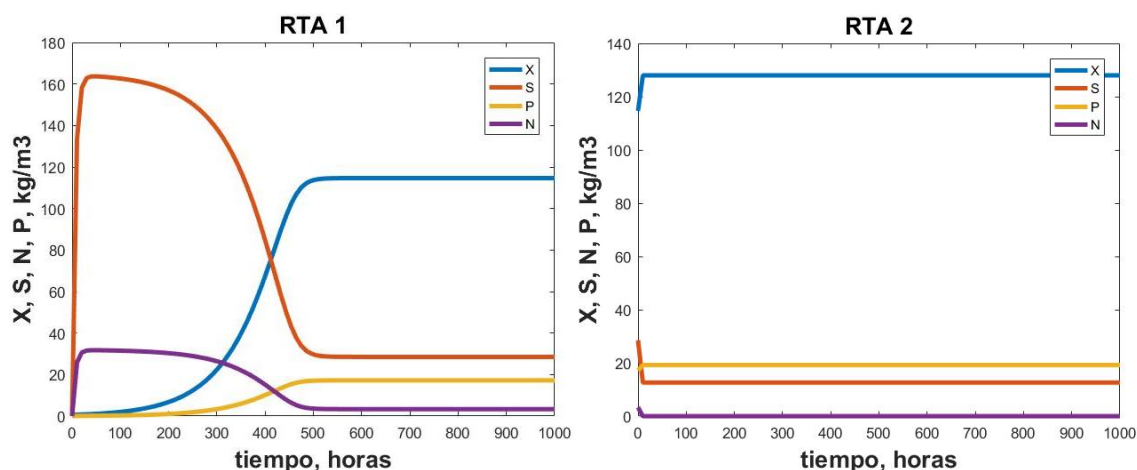


Figura 19. Representación gráfica del proceso en los dos RTA dispuestos en serie.

Al observar que la concentración de DHA obtenida a la salida del primer RTA no difiere significativamente de la del segundo (Figura 19, Tabla 14), se decide probar si mejoraría el proceso alimentar el segundo RTA con una corriente del sustrato carbonado, para asegurar que su concentración se encuentre en exceso. Se considera que el segundo reactor se alimente con una concentración total de 48,5 kg/m³ de sustrato carbonado, en comparación con los 28,5 kg/m³ de la disposición anterior.

B) Scripts para la configuración de 2 RCTA en serie, alimentando el segundo con una corriente fuente de carbono

- RTA 1

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

%-----CONSTANTES-----

```
mumax1=0.18; % Velocidad especifica máxima de crecimiento RTA1(h-1)
ks1=2.5; % Constante de saturación RTA1 (kg/m3)
kn1=0.01; % Constante
Y0xs1=0.84; % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA1 (kg
biomasa/kg fuente de carbono)
ms1=0; % Coeficiente de mantenimiento de células RTA1 (kg fuente
de carbono/kg biomasa/h)
Y0xn1=4; % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA1 (kg
biomasa/kg fuente de nitrógeno)
mn1=0; % Coeficiente de mantenimiento de células RTA1 (kg fuente
de nitrógeno/kg biomasa/h)
alfa1=0.15; % Coeficiente de formación de producto asociado al
crecimiento RTA1 (kg producto/kg biomasa)
beta1=0; % Coeficiente de formación de producto no asociado al
crecimiento RTA1 (kg producto/kg biomasa/h)
```

```
% -----CONDICIONES INICIALES-----

ts1=0;          % Tiempo inicial RTA1 (h)
tf1=1000;       % Tiempo final RTA1 (h)
D1=0.165;       % Factor de dilución RTA1 (Q/V1, h-1)
X01=0.63;       % Concentración de biomasa inicial RTA1 (kg/m3)
S01=0;          % Concentración de fuente de carbono inicial RTA1 (kg/m3)
Se1=165;        % Concentración de fuente de carbono en la alimentación
RTA1(kg/m3)
Ne1=32;         % Concentración de nitrógeno a la entrada
N01=0;          % Concentración de fuente de nitrógeno inicial RTA1
(kg/m3)
P01=0;          % Concentración de producto inicial RTA1 (kg/m3)

% Las condiciones iniciales del RTA2 son las finales del RTA2

n=100;          % número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=fun(t,y)
constantes;

%Formulación de variables
X1=y(1); S1=y(2); N1=y(3); P1=y(4);

%Ecuaciones del sistema
mul=mumax1*S1/(ks1+S1)*N1/(kn1+N1); % modificado incluyendo en N.
qs1=mul/Y0xs1+ms1;
qn1=mul/Y0xn1+mn1;
qp1=alfal*mul+beta1;

%Sistema de Ecuaciones diferenciales
dX1dt=(mul-D1)*X1;
dS1dt=D1*(Se1-S1)-qs1*X1;
dN1dt=D1*(Ne1-N1)-qn1*X1;
dP1dt=qp1*X1-D1*P1;

dydt=[dX1dt; dS1dt; dN1dt; dP1dt];
end
```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```
%-----ODE-----

constantes
tspan1=[ts1 tf1];
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);
y0=[X01 S01 N01 P01];
[tm1,ym1]=ode15s(@fun,tspan1,y0,options);
t_n1=linspace(ts1,tf1,n); % n puntos de tiempo para
mostrar
y_n1=interp1(tm1,ym1,t_n1,'spline'); % n valores de concentración
para mostrar
Xsim1=y_n1(:,1);Ssim1=y_n1(:,2);Nsim1=y_n1(:,3);Psim1=y_n1(:,4);
Valores_finales1=y_n1(end,:)
```



```
%-----GRAFICOS-----

figure(1)
plot(t_n1,Xsim1,t_n1,Ssim1,t_n1,Psim1,t_n1,Nsim1,'linewidth',3);
title('RTA 1','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('X, S, N, P, kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('X','S','P','N')
hold on

% Datos
resultados1=[t_n1,Xsim1,Ssim1,Nsim1,Psim1,];
```

- RTA 2

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

```
% -----CONDICIONES INICIALES-----

ts2=0;           % Tiempo inicial RTA2 (h)
tf2=1000;        % Tiempo final RTA2 (h)
D2=0.165;        % Factor de dilución RTA2 (Q/V2, h-1)

X02=114.6417;    % Concentración de biomasa inicial RTA2(kg/m3)
S02=28.5218;    % Concentración de fuente de carbono inicial RTA2
(kg/m3)
N02=3.3396;      % Concentración de fuente de nitrógeno inicial RTA2
(kg/m3)
P02=17.1963;    % Concentración de producto inicial RTA2 (kg/m3)
S2=20;          % Concentración de fuente de carbono aportada al
RTA2 (kg/m3)

Xe2=X02;         % Concentración de biomasa en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
Se2=S02+S2;      % Concentración de fuente de carbono en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
Ne2=N02;         % Concentración de fuente de nitrógeno en la alimentación
RTA2 (kg/m3)
Pe2=P02;         % Concentración de producto en la alimentación
RTA2 (kg/m3)

% Las condiciones iniciales del RTA2 son las finales del RTA2

n=100;           % número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=fun(t,y)
constantes;

%Formulación de variables
X2=y(1); S2=y(2); N2=y(3); P2=y(4);
```

```

%Ecuaciones del sistema
mu2=mumax2*S2/(ks2+S2)*N2/(kn2+N2);
qs2=mu2/Y0xs2+ms2;
qn2=mu2/Y0xn2+mn2;
qp2=alfa2*mu2+beta2;

%Sistema de Ecuaciones diferenciales
dX2dt=D2*(Xe2-X2)+mu2*X2;
dS2dt=D2*(Se2-S2)-qs2*X2;
dN2dt=D2*(Ne2-N2)-qn2*X2;
dP2dt=D2*(Pe2-P2)+qp2*X2;

dydt=[dX2dt; dS2dt; dN2dt; dP2dt;];
end

```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```

%-----ODE-----

constantes
tspan2=[ts2 tf2];
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);
y0=[X02 S02 N02 P02];
[tm2,ym2]=ode15s(@fun,tspan2,y0,options);
t_n2=linspace(ts2,tf2,n); % n puntos de tiempo para
mostrar
y_n2=interp1(tm2,ym2,t_n2,'spline'); % n valores de concentración
para mostrar
Xsim2=y_n2(:,1);Ssim2=y_n2(:,2);Nsim2=y_n2(:,3);Psim2=y_n2(:,4);
Valores_finales2=y_n2(end,:);

figure(1)
plot(t_n2,Xsim2,t_n2,Ssim2,t_n2,Psim2,t_n2,Nsim2,'linewidth',3);
title('RTA 2','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('X, S, N, P, kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('X','S','P','N')
hold on

% Datos
resultados2=[t_n2',Xsim2,Ssim2,Nsim2,Psim2];

```

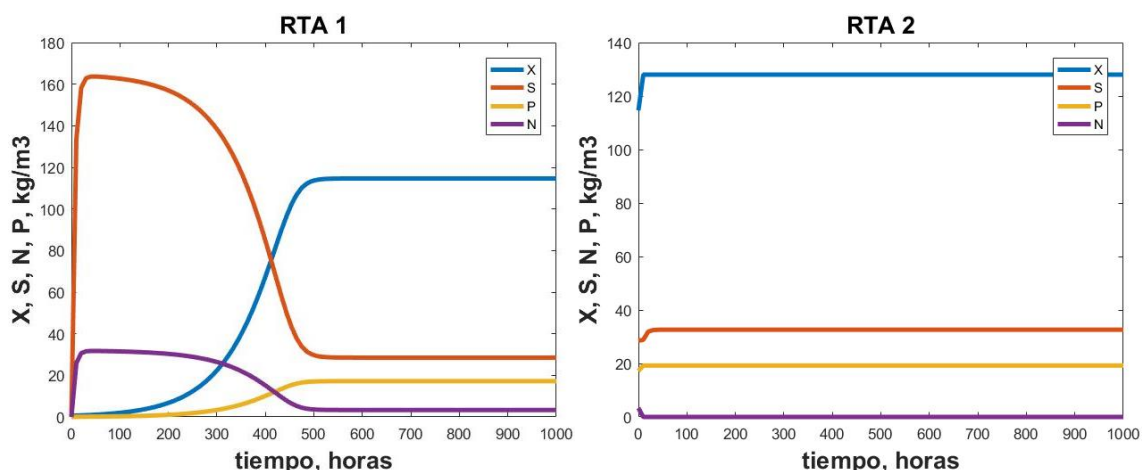


Figura 20. Representación gráfica del proceso en los dos RTA dispuestos en serie con el segundo alimentado.

Se advierte que la concentración de DHA obtenida tampoco varía significativamente (Figura 20, Tabla 14), además, se produce una acumulación de la fuente de carbono que se traduce en un derroche de materia prima, y a su vez de dinero. Considerando el costo de la fabricación de un segundo biorreactor y sus gastos de operación, que serían muy elevados, se decide operar con un solo reactor continuo de tanque agitado.

C) Scripts para la configuración de 1 RCTA

El primero es el script en el que se introduce la información relativa al estado del sistema, es decir, las constantes:

```
%-----CONSTANTES-----

mumax1=0.18; % Velocidad especifica máxima de crecimiento RTA1(h-1)
ks1=2.5;     % Constante de saturación RTA1 (kg/m3)
kn1=0.01;   % Constante
Y0xs1=0.84; % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA1 (kg
biomasa/kg fuente de carbono)
ms1=0;      % Coeficiente de mantenimiento de células RTA1 (kg fuente
de carbono/kg biomasa/h)
Y0xn1=4;    % Factor de rendimiento biomasa sustrato RTA1 (kg
biomasa/kg fuente de nitrógeno)
mn1=0;      % Coeficiente de mantenimiento de células RTA1 (kg fuente
de nitrógeno/kg biomasa/h)
alfal=0.15; % Coeficiente de formación de producto asociado al
crecimiento RTA1 (kg producto/kg biomasa)
betal=0;    % Coeficiente de formación de producto no asociado al
crecimiento RTA1 (kg producto/kg biomasa/h)

% -----CONDICIONES INICIALES-----

ts1=0;      % Tiempo inicial RTA1 (h)
tf1=1000;   % Tiempo final RTA1 (h)
D1=0.165;   % Factor de dilución RTA1 (Q/V1, h-1)
```

```
X01=0.63;      % Concentración de biomasa inicial RTA1(kg/m3)
S01=0;         % Concentración de fuente de carbono inicial RTA1 (kg/m3)
Se1=165;       % Concentración de fuente de carbono en la alimentación
RTA1(kg/m3)
Ne1=32;        % Concentración de nitrógeno a la entrada
N01=0;         % Concentración de fuente de nitrógeno inicial RTA1
(kg/m3)
P01=0;         % Concentración de producto inicial RTA1 (kg/m3)

n=100;         % Número de datos a mostrar
```

El segundo corresponde al cálculo de las ecuaciones diferenciales del sistema:

```
function dydt=fun(t,y)
constantes;

%Formulación de variables
X1=y(1); S1=y(2); N1=y(3); P1=y(4);

%Ecuaciones del sistema
mul=mumax1*S1/(ks1+S1)*N1/(kn1+N1);
qs1=mul/Y0xs1+ms1;
qn1=mul/Y0xn1+mn1;
qp1=alfa1*mul+beta1;

%Sistema de Ecuaciones diferenciales
dX1dt=(mul-D1)*X1;
dS1dt=D1*(Se1-S1)-qs1*X1;
dN1dt=D1*(Ne1-N1)-qn1*X1;
dP1dt=qp1*X1-D1*P1;

dydt=[dX1dt; dS1dt; dN1dt; dP1dt];
end
```

En el tercer script se resuelven las ecuaciones diferenciales y se representan gráficamente los datos obtenidos:

```
%-----ODE-----

constantes
tspan1=[ts1 tf1];
options=odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);
y0=[X01 S01 N01 P01];
[tm1,ym1]=ode15s(@fun,tspan1,y0,options);
t_n1=linspace(ts1,tf1,n);          % n puntos de tiempo para
mostrar
y_n1=interp1(tm1,ym1,t_n1,'spline'); % n valores de concentración
para mostrar
Xsim1=y_n1(:,1);Ssim1=y_n1(:,2);Nsim1=y_n1(:,3);Psim1=y_n1(:,4);
Valores_finales1=y_n1(end,:);

D1X1_D1P1=[D1*y_n1(end,1) D1*y_n1(end,4)]

%-----GRAFICOS-----
```

```
figure(1)
plot(t_n1,Xsim1,t_n1,Ssim1,t_n1,Psim1,t_n1,Nsim1,'linewidth',3);
title('Reactor de tanque agitado','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('X, S, N, P, kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
legend('X','S','P','N')
hold on

figure(2)
plot(t_n1,Xsim1,'linewidth',3);
title('Reactor de tanque agitado','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('X kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
grid on
hold on

figure (3)
plot(t_n1,Ssim1,'linewidth',3);
title('Reactor de tanque agitado','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('S kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
grid on
hold on

figure (4)
plot(t_n1,Nsim1,'linewidth',3);
title('Reactor de tanque agitado','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('N kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
grid on
hold on

figure (5)
plot(t_n1,Psim1,'linewidth',3);
title('Reactor de tanque agitado','FontSize',16,'FontWeight','bold')
xlabel('tiempo, horas','FontSize',16,'FontWeight','bold')
ylabel('P kg/m3','FontSize',16,'FontWeight','bold')
grid on
hold on

% Datos
resultados1=[t_n1',Xsim1',Ssim1',Nsim1',Psim1',];
```

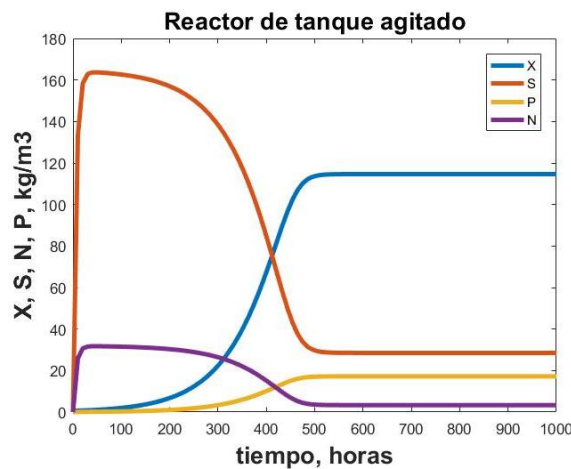


Figura 21. Representación gráfica del proceso en 1 RTA.

Tabla 14. Resultados obtenidos tras la simulación en Matlab 2016® de los tres modos de operación propuestos.

	2 RTA en serie		1 RTA	2 RTA en serie, 2º alimentado	
	RTA 1	RTA 2		RTA 1	RTA 2
X (kg/m³)	114,6417	127,9949	114,6417	114,6417	127,9955
S (kg/m³)	28,5218	12,6251	28,5218	28,5218	32,6244
N (kg/m³)	3,3396	0,0013	3,3396	3,3396	0,0011
P (kg/m³)	17,1963	19,1993	17,1963	17,1963	19,1994

Finalmente, el comportamiento del sistema de estudio viene definido por las ecuaciones 1, 2, 3 y 4:

$$\frac{dX}{dt} = \left(0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N} - D \right) \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_e - S) - \left(\frac{0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N}}{0,84} \right) \cdot X \quad (2)$$

$$\frac{dN}{dt} = D \cdot (N_e - N) - \left(\frac{0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N}}{4} \right) \cdot X \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left(0,15 \cdot 0,18 \frac{S}{2,5 + S} \frac{N}{0,01 + N} \right) \cdot X - D \cdot P \quad (4)$$

Anexo III. Condiciones de cultivo

Para conocer los valores óptimos de la tasa de dilución (D), la concentración de glucosa en la entrada (S_e) y la concentración de nitrógeno en la entrada (N_e) se simula el proceso con la herramienta Matlab 2016® empleando distintos valores. En cada simulación se varía uno de los parámetros y los demás se mantienen constantes.

Para conocer los valores óptimos de la tasa de dilución (D) se representa la productividad de biomasa y producto frente a la tasa de dilución (Figura 22 y **Figura 23**). En ambos casos se alcanza una mayor productividad a un valor de $D = 0,165 \text{ h}^{-1}$, así que este es el valor con el que se va a operar.

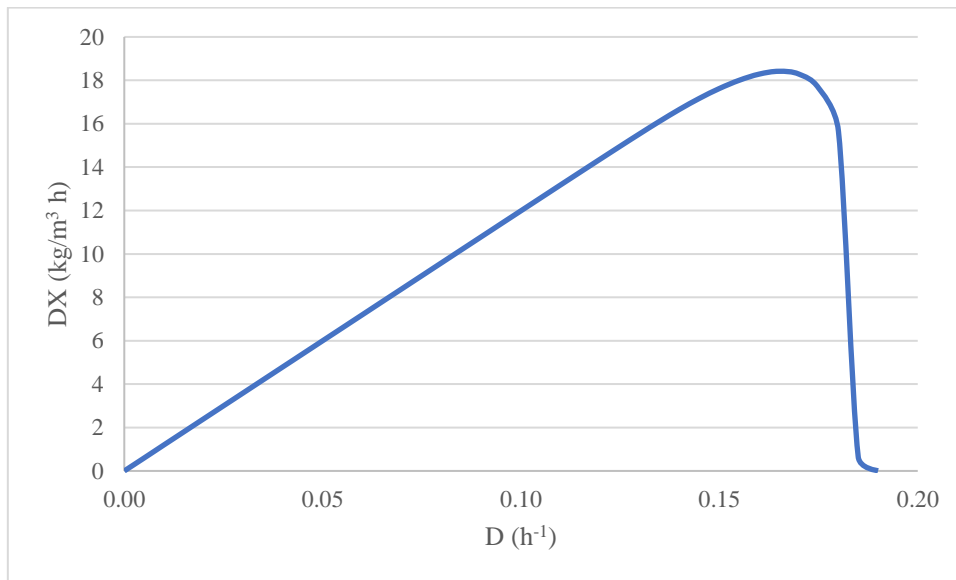


Figura 22. Productividad de biomasa.

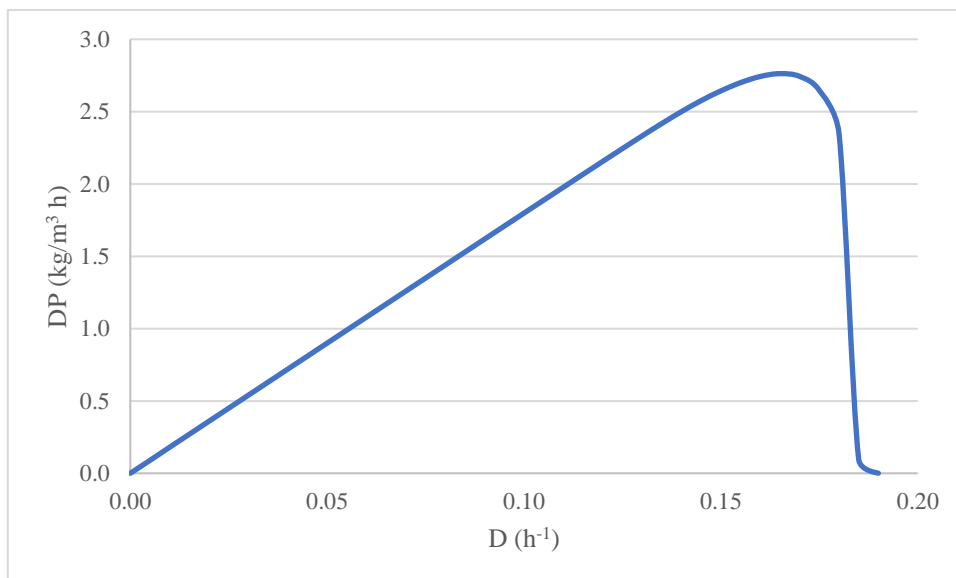


Figura 23. Productividad de DHA.

Para conocer los valores óptimos de la concentración de glucosa en la entrada (Se) se representa la productividad de biomasa y producto frente a concentración de glucosa (Figura 24 y Figura 25). En ambos casos la productividad comienza a mantenerse constante a un valor de $Se=165 \text{ kg/m}^3$, así que este es el valor con el que se va a operar.

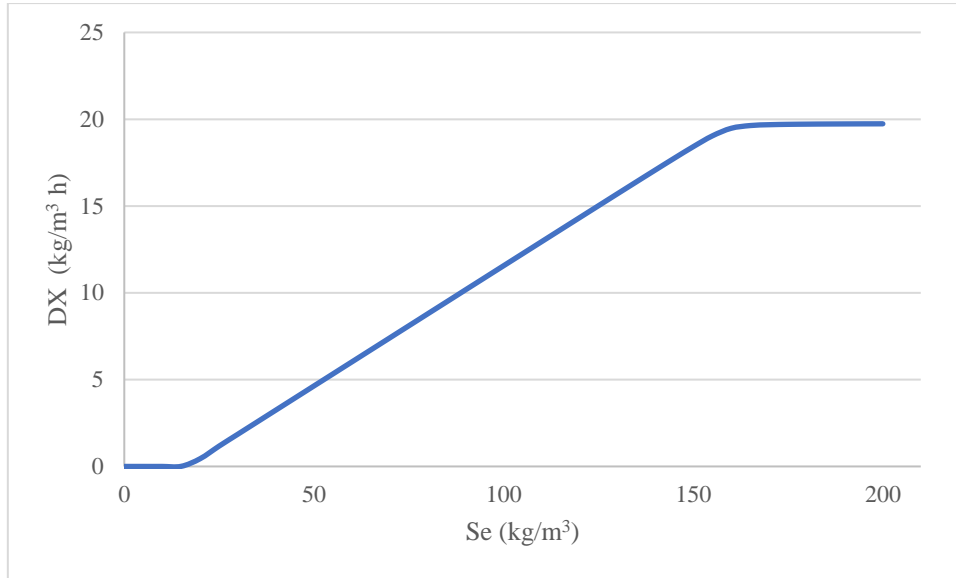


Figura 24. Productividad de biomasa frente a concentración de glucosa en la entrada.

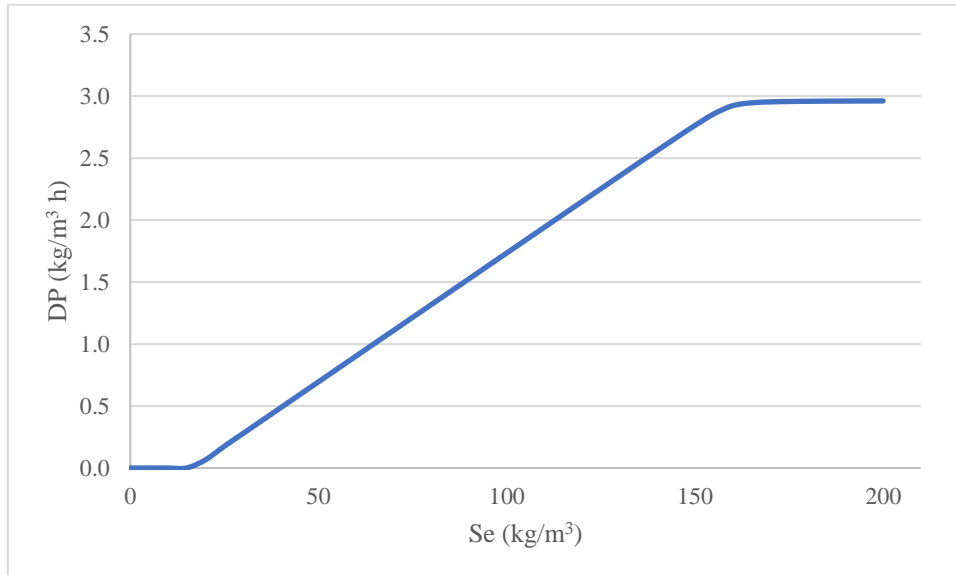


Figura 25. Productividad de DHA frente a concentración de glucosa en la entrada.

Para conocer los valores óptimos de la concentración de nitrógeno en la entrada (Ne) se representa la productividad de biomasa y producto frente a concentración de nitrógeno (Figura 26 y Figura 27). En ambos casos la productividad comienza a mantenerse constante a un valor de $Ne=32 \text{ kg/m}^3$, así que este es el valor con el que se va a operar.

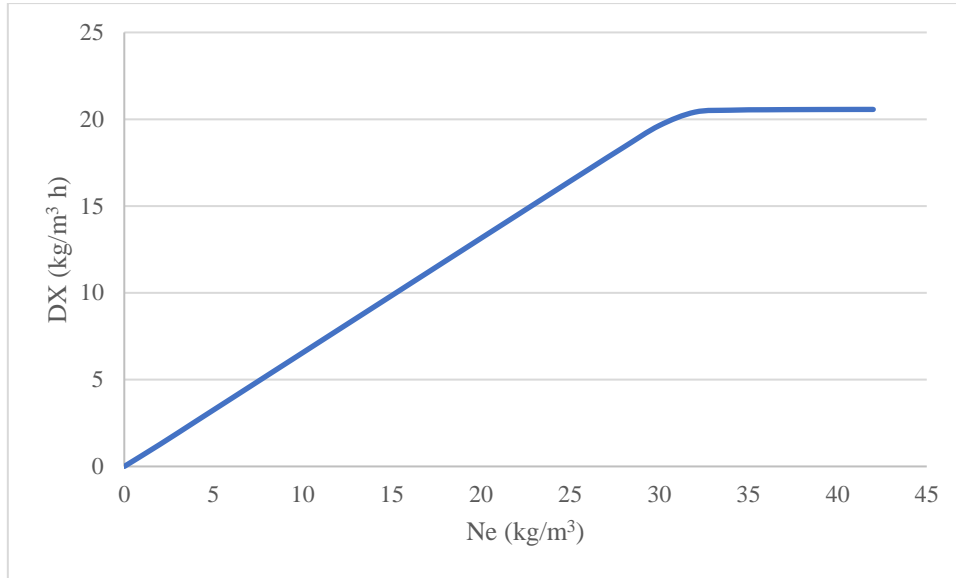


Figura 26. Productividad de biomasa frente a concentración de nitrógeno en la entrada.

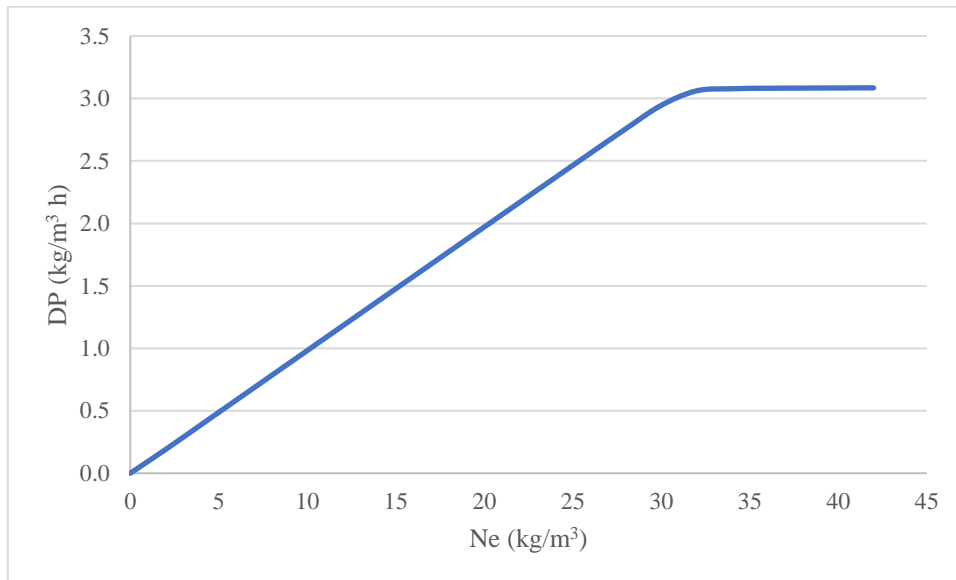


Figura 27. Productividad de DHA frente a concentración de nitrógeno en la entrada.

Anexo IV. Cálculo de la productividad

Al realizar el estudio para conocer los valores óptimos de la tasa de dilución (D), la concentración de glucosa en la entrada (Se) y la concentración de nitrógeno en la entrada (Ne), se calcula gráficamente la productividad del proceso respecto a la biomasa y al producto, como se muestra en la Figura 22 y Figura 23 respectivamente.

La curva de productividad respecto a la biomasa (DX) tiene su punto máximo en el valor $18,42 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, y la productividad respecto al producto (DP) en $2,76 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Para corroborarlo se calculan dichos valores con la herramienta Matlab 2016®, como se muestra en el apartado C del Anexo II. Se obtienen unos valores de $18,92 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para la productividad respecto a la biomasa (DX) y $2,84 \text{ kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para la productividad respecto al producto (DP).

Ambos resultados son muy parecidos, pero el cálculo con Matlab 2016® es más preciso, por lo que se toman estos valores como los alcanzados durante el proceso.

Anexo V. Cálculo de las dimensiones características del biorreactor

El volumen del reactor se calcula con la Ecuación 5, la cual requiere la producción anual objetivo (50 Tn de PUFAs) y la productividad calculada en el Anexo IV (2,84 kg m⁻³ h⁻¹):

$$V = \frac{\text{Producción anual de DHA} \left(\frac{kg}{h} \right)}{\text{Productividad} \left(\frac{kg}{m^3 h} \right)} \quad (5)$$

$$50 \frac{Tn}{año} \frac{1 año}{8400 h^*} \frac{10^3 kg}{1 Tn} = 5,95 \frac{kg}{h}$$

* Considerando 15 días de parada al año para mantenimiento: (365-15)·24=8400 h.

$$V = \frac{5,95}{2,84} = 2,1 m^3$$

Según los cálculos, el volumen del reactor para la producción objetivo propuesta es de 2,1 m³, pero considerando que este valor es bruto y que luego se realiza una extracción sólido-líquido, se aumentará el volumen del reactor hasta 5 m³, para asegurar el cumplimiento del objetivo. Por cuestiones de seguridad se debe dejar libre un 25% del volumen en cabeza, así que el volumen de trabajo será de 3,75 m³.

A continuación, a partir de la Ecuación 5 se calcula la producción bruta que se consigue al trabajar con esta capacidad:

$$\text{Producción anual de DHA} \left(\frac{kg}{h} \right) = V (m^3) \cdot \text{Productividad} \left(\frac{kg}{m^3 h} \right)$$

$$\text{Producción anual bruta de DHA} = 3,75 \cdot 2,84 = 10,65 \frac{kg}{h} = 89,46 \frac{Tn}{año}$$

La producción de DHA al año obtenida es superior al objetivo, por tanto, se toma como adecuado trabajar con un volumen de 5 m³.

Asumiendo que el biorreactor tiene forma de cilindro (Ecuación 19) y una relación altura/diámetro con valor de 1,25 (valor típico para biorreactores), se calcula el diámetro interno:

$$V = \pi \cdot \frac{T^2}{4} \cdot H \quad (19)$$

$$\frac{H}{T} = 1,25 \rightarrow H = 1,25 \cdot T$$

$$V = \pi \cdot \frac{T^2}{4} \cdot 1,25 \cdot T = \pi \cdot \frac{T^3}{4} \cdot 1,25$$

$$T = \sqrt[3]{\frac{4 \cdot V}{1,25 \cdot \pi}} = \sqrt[3]{\frac{4 \cdot 3,75}{1,25 \cdot \pi}} = 1,56 \text{ m}$$

El valor del diámetro interior será de 1,56 m. A continuación, la Tabla 15 recoge todos los valores de las dimensiones características del biorreactor.

Tabla 15. Dimensiones características del biorreactor.

H/T	1,25
Volumen total, V_r (m³)	5
Volumen de trabajo, V_t (m³)	3,75
Diámetro interno, T (m)	1,56

Anexo VI. Diseño mecánico del biorreactor

A) Selección del material del biorreactor

Por regla general, se emplea acero inoxidable austenítico para la fabricación de biorreactores. Los aceros inoxidables austeníticos son aleaciones hierro-carbono con bajo contenido en carbono (C) y una concentración mínima de cromo (Cr) del 11%, que le confiere una resistencia a la corrosión en muchos ambientes. Esta resistencia mejora con la adición de níquel (Ni) y molibdeno (Mo). No presentan comportamiento magnético (Callister, 2016).

Actualmente, el acero inoxidable austenítico 304 es el que se suele utilizar y soporta hasta 0,5 g de NaCl/L; en cambio, los biorreactores contruidos con acero inoxidable austenítico 316L pueden soportar hasta 1,6 g de NaCl/L (Behrens & Kyle, 1996; da Silva et al., 2019). Teniendo en cuenta que el medio de cultivo presenta un alto grado de salinidad, el material seleccionado para la construcción del biorreactor de producción de aceite rico en DHA es el acero inoxidable austenítico 316L cuya composición y propiedades físicas se muestran en la Tabla 16 y Tabla 17.

Tabla 16. Propiedades físicas del AI 316 (Callister, 2016).

	20 °C	100 °C	200 °C	300 °C	400 °C
Módulo de elasticidad (GPa)	200	194	186	179	172
Coefficiente medio de dilatación térmica entre 20 °C (10^{-6} K^{-1})	-	16	16,5	17	17,5
Conductividad térmica (W/m·K)	15	16	17,5	19	21
Resistencia eléctrica ($\Omega \cdot \text{mm}^2/\text{m}$)	0,75	0,82	0,95	1,05	1,12

B) Cálculo del espesor mínimo de la carcasa

El código ASME sección VIII, División I, establece que el valor mínimo que puede adoptar el espesor de la carcasa vendrá definido por el mayor obtenido de las Ecuaciones 6 y 7:

$$t_{circunferencial} = \frac{P_d \cdot R_i}{S \cdot E - 0,6 \cdot P_d} + c \quad (6)$$

$$t_{longitudinal} = \frac{P_d \cdot R_i}{2 \cdot S \cdot E - 0,4 \cdot P_d} + c \quad (7)$$

Donde:

- P_d corresponde a la presión de diseño (kg/mm^2).
- R_i corresponde al radio interno del biorreactor (mm).
- S corresponde al valor de la tensión máxima admisible (kg/mm^2).
- E corresponde a la eficiencia de la soldadura.
- c corresponde al sobre-espesor de corrosión (mm).

Presión de diseño (P_d)

La presión de diseño se puede estimar relacionando la presión de operación (P_{op}) con los siguientes casos:

1. La presión de diseño será un 110% el valor de la presión de operación.
2. La presión de diseño será el valor de la presión de operación más 2 kg/cm^2 .
3. El valor de la presión de diseño será $3,5 \text{ kg/cm}^2$.

De estas tres opciones se seleccionará la que mayor valor de presión de diseño proporcione.

Siendo la presión de operación 1 atm , obtenemos los siguientes resultados para las relaciones definidas anteriormente:

$$1 \text{ atm} = 1,033 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$1,033 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2} \cdot 110\% = 1,136 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$1,033 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2} + 2 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2} = 3,033 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$3,5 \frac{kg}{cm^2}$$

El valor más alto obtenido es el de 3,5 kg/cm², por tanto, este será el valor de presión de diseño con el que se va a trabajar.

Temperatura de diseño (T_d)

La temperatura de operación (T_{op}) es de 25 °C, para conocer el valor de la temperatura de diseño se le deben sumar a la de operación 20 °C.

$$T_d = T_{op} + 20 \text{ °C}$$

$$T_d = 25 \text{ °C} + 20 \text{ °C} = 45 \text{ °C}$$

Tensión máxima admisible (S)

La tensión máxima admisible (S) depende del tipo de material escogido y del coeficiente de seguridad seleccionado, su valor corresponde con el resultado más pequeño de las siguientes relaciones según el código ASME sección VIII, División I:

$$S = \frac{R}{4}$$

$$S = \frac{5}{8} \cdot Y$$

$$S = \frac{2}{3} \cdot f_r$$

Siendo:

- R, resistencia a tracción (kg/cm²).
- Y, límite elástico (kg/cm²).
- fr, carga de rotura por alargamiento en 100.000 horas (kg/cm²), cuando se selecciona un acero austenítico, este valor es aproximadamente el 35% del valor de su tensión máxima (R).

Tabla 17. Denominaciones, composiciones, propiedades mecánicas y principales aplicaciones para aceros inoxidables (Callister, 2016).

Número AISI	Número UNS	Composición (% en peso) ^a	Condición ^b	Propiedades mecánicas			Aplicaciones
				Resistencia a tracción (MPa)	Límite elástico (MPa)	Ductilidad (%A en 50 mm)	
Ferríticos							
409	S40900	0,08 C, 11,0 Cr, 1,0 Mn, 0,50 Ni, 0,75 Ti	Recocido	380	205	20	Componentes de escape de automóviles, tanques para pulverizaciones agrícolas
446	S44600	0,20 C, 25 Cr, 1,5 Mn	Recocido	515	275	20	Válvulas (alta temperatura), moldes para vidrio, cámaras de combustión
Austeníticos							
304	S30400	0,08 C, 19 Cr, 9 Ni, 2,0 Mn	Recocido	515	205	40	Equipos de procesamiento químico y de alimentos, recipientes criogénicos
316L	S31603	0,03 C, 17 Cr, 12 Ni, 2,5 Mo, 2,0 Mn	Recocido	485	170	40	Soldadura de construcción
Martensíticos							
410	S41000	0,15 C, 12,5 Cr, 1,0 Mn	Recocido T&R	485 825	275 620	20 12	Cañones de fusil, cubiertos, componentes de motores de combustión
440A	S44002	0,70 C, 17 Cr, 0,75 Mo, 1,0 Mn	Recocido T&R	725 1790	415 1650	20 5	Cuberterías, engranajes, herramientas quirúrgicas
Endurecibles por precipitación							
17-7PH	S17700	0,09 C, 17 Cr, 7 Ni, 1,0 Al, 1,0 Mn	Endurecido por precipitación)	1450	1310	1–6	Muelles, cuchillos, recipientes a presión

^aEl resto de la composición es hierro.

^bT&R indica temple y revenido

Teniendo en cuenta que el material seleccionado es el acero inoxidable 316L, la Tabla 17 proporciona los valores de la resistencia a tracción (R) y el límite elástico (Y). Los datos están en MPa por lo que es necesario realizar un cambio de unidades:

$$1 \text{ MPa} = 10,1972 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$R = 485 \text{ MPa} = 4945,64 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$Y = 170 \text{ MPa} = 1733,52 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$f_r = R \cdot 0,35 = 169,75 \text{ MPa} = 1730,97 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

A continuación, se procede a calcular el valor de la tensión máxima admisible haciendo uso de las relaciones proporcionadas por el código ASME sección VIII, División I:

$$S = \frac{R}{4} = \frac{4945,64}{4} = 1236,41 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$S = \frac{5}{8} \cdot Y = \frac{5}{8} \cdot 1733,52 = 1083,45 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

$$S = \frac{2}{3} \cdot f_r = \frac{2}{3} \cdot 1730,97 = 1153,98 \frac{\text{kg}}{\text{cm}^2}$$

El valor de la tensión máxima admisible es el resultado más pequeño que corresponde con 1083,45 kg/cm².

Eficiencia de la soldadura (E)

Para poder unir los elementos del reactor, estos se soldarán. La soldadura es un proceso de fijación donde dos piezas, generalmente de metal, se unen mediante la coalescencia (fusión) de estas. Las uniones crean irregularidades y discontinuidades en la superficie del reactor, donde pueden acumularse las tensiones que sufre el reactor, provocando fallos. La eficiencia de soldadura es un factor de reducción para la tensión máxima admisible, a la hora de calcular el espesor del tanque, que tiene en cuenta el hecho de que existan uniones soldadas. En función del tipo de soldadura y del control de calidad realizado sobre ella (radiografía) se definen varias soldaduras cada una con su eficiencia correspondiente.

Basándonos en los diferentes tipos de soldadura que propone el código ASME, las soldaduras serán de tipo 1 y con una radiografía por puntos, siendo el valor de la eficiencia de la soldadura E=0,85.

Sobre-espesor de corrosión (c)

Este valor de sobre-espesor será añadido al valor de espesor mínimo para compensar los efectos que la corrosión ejercerá sobre el material del que estará fabricado el reactor, a lo largo de su vida útil. El valor varía en función del material utilizado, en nuestro caso ha sido seleccionado el acero inoxidable, que presenta un rango de valores de sobre-espesor entre 0,8 y 1,5 mm. Puesto que en el proceso se generan productos con gran poder corrosivo, se ha seleccionado un valor de sobre-espesor $c=1,5$ mm.

Existe una condición para poder utilizar las ecuaciones del código ASME (Ecuaciones 6 y 7) y es que el valor de la presión de diseño debe ser igual o menor que el producto de 0,385 por el valor de la tensión máxima admisible por el valor de la eficiencia de la soldadura:

$$P_d \leq 0,385 \cdot S \cdot E$$

$$3,5 \frac{kg}{cm^2} \leq 0,385 \cdot 1083,45 \frac{kg}{cm^2} \cdot 0,85$$

$$3,5 \frac{kg}{cm^2} \leq 354,56 \frac{kg}{cm^2}$$

La condición se cumple, por tanto, se procede a calcular el espesor mínimo de la carcasa:

$$t_{circunferencial} = \frac{P_d \cdot R_i}{S \cdot E - 0,6 \cdot P_d} + c = \frac{0,035 \cdot 781,59}{10,8345 \cdot 0,85 - 0,6 \cdot 0,035} + 1,5 = 4,48 \text{ mm}$$

$$t_{longitudinal} = \frac{P_d \cdot R_i}{2 \cdot S \cdot E - 0,4 \cdot P_d} + c = \frac{0,035 \cdot 781,59}{2 \cdot 10,8345 \cdot 0,85 - 0,4 \cdot 0,035} + 1,5 = 2,99 \text{ mm}$$

El valor del $t_{circunferencial}$ es el mayor, por tanto, este será el valor del espesor mínimo de la carcasa teórico. Para evitar fallos y accidentes se aumenta un 2%, así que el espesor mínimo de la carcasa corresponde con 5,38 mm.

Consultando los valores de espesores fabricados por diversos proveedores, se ha encontrado que las planchas comercializadas con un espesor inmediatamente superior al

t_{\min} calculado serían de 6 mm. Una vez conocido el valor del espesor de la carcasa, se calcula el valor del diámetro exterior de ésta haciendo uso de la Ecuación 8.

$$D_e = T + 2 \cdot t \quad (8)$$

$$D_e = 1563,19 + 2 \cdot 6 = 1575,19 \text{ mm}$$

C) Diseño de los fondos

Primero se debe seleccionar el tipo de fondo que se va a utilizar para el reactor, a continuación, se muestran los diferentes tipos de fondos que se pueden diseñar (INEVID, 2014):

- Fondos semiesféricos: tienen forma semiesférica y están conectados directamente a la carcasa cilíndrica. El principal inconveniente es que este tipo de geometría resulta muy difícil de construir además presenta un elevado coste para sistemas de bajas presiones, por eso se emplean en el caso de precisarse un gran espesor con otros tipos de fondos o en el caso de recipientes realizados con materiales especiales.
- Fondos elípticos: se forma mediante una elipse de revolución con semiejes en la relación 2/1, es el más empleado, debido a la facilidad de su estampación.
- Fondos policéntricos o semielípticos: son los fondos más económicos y soportan presiones de hasta 15 bares. Este tipo de fondo precisan una pestaña para unirlos a la carcasa del reactor, y lo componen un arco de radio y un radio entre el 8% y el 10% más pequeño que el primero. Existen dos tipos de fondos semielípticos: el toriesférico tipo Klopfer (DIN-28011) y el semielíptico tipo Korbbogen (DIN-28013).
- Fondos cónicos: tienen forma de cono y se unen a la carcasa con una unión a tope, ofrecen poca resistencia a la presión y su uso se limita a fondos con un semiángulo inferior a 20°, permitiéndose semiángulos de hasta 30°. Existen también fondos toricónicos, que se unen a la carcasa por una pestaña de unión, no se recomienda su uso para semiángulos superiores a 45°.
- Fondos planos: se trata de una chapa plana soldada a la cubierta del recipiente. Se requiere un alto espesor para aguantar la presión.

Finalmente nos decantamos por el fondo toriesférico tipo Klopper (Figura 28), ya que es uno de los fondos más utilizados para el cultivo de microalgas heterótrofas en biorreactores de tanque agitado. Además, se cumplen los requerimientos que limitarían su uso:

- Presión de diseño inferior a 7 Kg/cm^2 .
- Temperatura de diseño inferior a $350 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Recipientes verticales con relación $H/D < 10$.

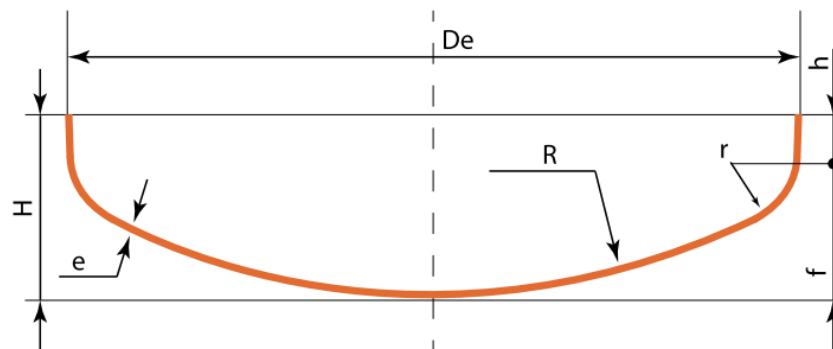


Figura 28. Esquema del fondo toriesférico tipo Klopper.

Las relaciones entre los parámetros necesarios para el dimensionamiento del fondo se muestran a continuación en la Tabla 18.

Tabla 18. Ecuaciones para dimensionar el fondo Klopper (Fondeyur, s.f.).

Radio esférico interior (R)	$R = D_e$
Radio rebordeo interior (r)	$r = R/10$
Espesor fondo (e)	$e = t_F$
Altura pestaña (h)	$h \geq 3,5 \cdot e$
Altura curvado (f)	$f = 0,1935 \cdot D_e - 0,455 \cdot e$
Altura total fondo (H)	$H = e + h + f$
Diámetro de disco de partida (D_d)	$D_d = 1,11 \cdot D_e + 1,85 \cdot h$
Volumen útil de cabeza sin pestaña (V_f)	$V_f = 0,13 \cdot T^3$

Como se observa en la Tabla 18, es necesario conocer el valor del espesor para calcular los demás parámetros. El código ASME determina que el espesor mínimo del fondo Klopper se calcula a partir de la Ecuación 9:

$$t_F = \frac{P_d \cdot D_e \cdot M}{2 \cdot S \cdot E - 0,2 \cdot P_d} + c \quad (9)$$

Donde:

- P_d es la presión de diseño (kg/mm^2).
- D_e es el valor del diámetro externo del biorreactor (mm).
- S es el valor de la tensión máxima admisible (kg/mm^2).
- E es la eficiencia de la soldadura.
- C es el sobre-espesor de corrosión (mm).
- M es el coeficiente que relaciona los radios de curvatura R (radio esférico interior) y r (radio de rebordo interior). Se calcula según la Ecuación 20.

$$M = \frac{1}{4} \cdot \left[3 + \sqrt{\frac{R}{r}} \right] \quad (20)$$

$$R = D_e = 1575,19 \text{ mm}$$

$$r = \frac{R}{10} = \frac{1575,19}{10} = 157,52 \text{ mm}$$

$$M = \frac{1}{4} \cdot \left[3 + \sqrt{\frac{1575,19}{157,52}} \right] = 1,54$$

Una vez calculado el valor de M se procede a calcular el espesor mínimo de los fondos:

$$t_F = \frac{P_d \cdot D_e \cdot M}{2 \cdot S \cdot E - 0,2 \cdot P_d} + c = \frac{0,035 \cdot 1575,19 \cdot 1,54}{2 \cdot 10,8345 \cdot 0,85 - 0,2 \cdot 0,035} + 1,5 = 6,11 \text{ mm}$$

Igual que con el espesor mínimo de la carcasa, por motivos de seguridad se aumenta en un 2% el valor del espesor mínimo de los fondos, siendo finalmente de 7,33 mm.

Consultando los fabricantes de fondos, se han encontrado catálogos que proporcionan todos los espesores posibles, pero en este caso teniendo en cuenta el espesor de fondo teórico interesa que el real sea de 8 mm.

Finalmente, conocido el valor del espesor del fondo se calcula el valor de los demás parámetros para finalizar el dimensionamiento del fondo (Tabla 19).

Tabla 19. Dimensiones fondo Kloppe.

R (mm)	1575,19
r (mm)	157,52
e (mm)	8
h (mm)	28
f (mm)	301,16
H (mm)	337,16
D_a (mm)	1800,26
V_f (m³)	0,5

D) Selección y diseño del agitador

El mecanismo de agitación en el interior del biorreactor durante una fermentación asegura la suspensión homogénea de los microorganismos en el medio que contiene los nutrientes, consiguiendo así una transferencia de materia efectiva y aproximando lo máximo posible el sistema a un reactor de mezcla completa.

Para la elección del tipo de agitador hay que tener en cuenta la viscosidad del medio (Figura 29). El fluido que tendrá que agitar el mecanismo se considerará agua, por tanto, el valor de la viscosidad a la temperatura de operación ($T_{op} = 25\text{ °C}$) corresponde con 0,891 cP.

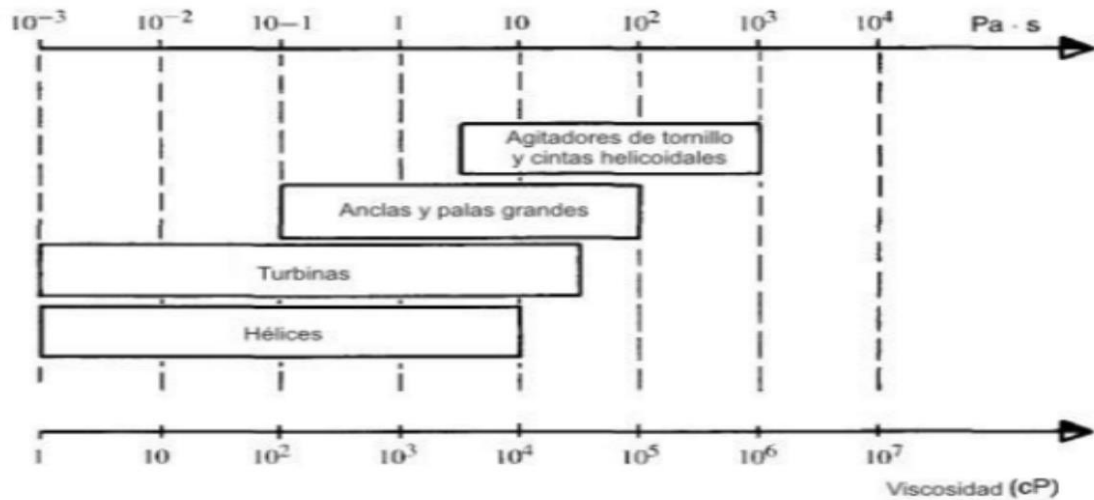
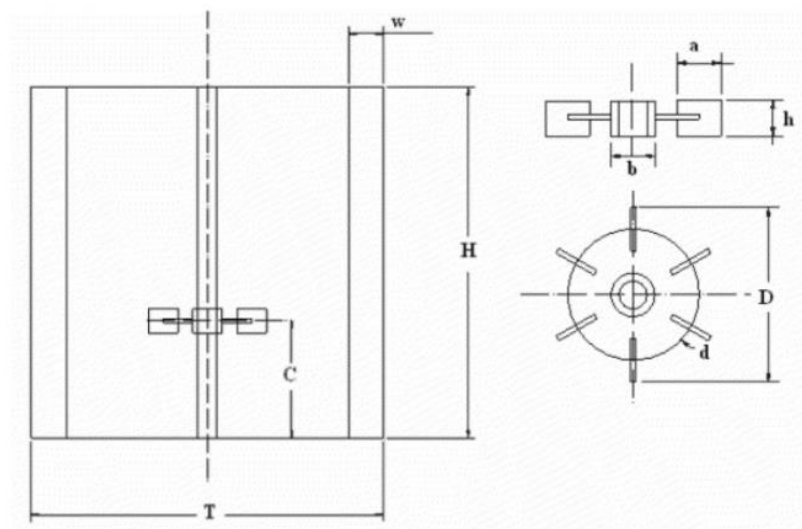


Figura 29. Gráfico para elegir tipo de agitador en función de la viscosidad del medio.

Para dicho valor de viscosidad los mejores agitadores son las hélices y las turbinas. Finalmente, se decide utilizar un agitador de turbina del tipo hojas planas y disco de 6 palas (Figura 30), ya que este tipo de impulsor trabaja principalmente para fluidos de baja viscosidad y para velocidades que pueden ser medias o altas. Además, este tipo de impulsor resulta más económico y fácil de construir que un agitador de hélice o de turbina con palas inclinadas.



H/T	C/T	w/T	D/T	d/D	a/D	h/D	b/D
1	1/3	1/10	1/3	3/4	1/4	1/5	1/5

Figura 30. Relaciones dimensionales impulsor tipo turbina Rushton de 6 palas (Belda Ferrin, 2013).

Una vez conocidas las semejanzas geométricas se obtienen los valores de las dimensiones generales del agitador, mostradas en la Tabla 20.

Tabla 20. Resumen dimensiones del agitador tipo turbina Rushton de 6 palas.

Diámetro interior del tanque, T (mm)	1563,19
Diámetro del impulsor, D (mm)	521,05
Altura del impulsor al fondo, C (mm)	521,05
Ancho de pala, h (mm)	104,21
Longitud de pala, a (mm)	130,26
Diámetro del eje central, b (mm)	104,21
Altura del líquido, H (mm)	1563,19
Diámetro del disco central, d (mm)	390,75
Inclinación palas (°)	60
Número de deflectores, n	4
Anchura de deflectores, W (mm)	156,32

Para el diseño se utilizarán cuatro placas deflectoras con el fin de evitar vórtices alrededor del eje y reducir de esta manera los esfuerzos que actúen sobre este.

Conocidas todas las dimensiones del agitador se procede a calcular el volumen que ocupará este en el interior del reactor. Primero, se debe conocer la altura del eje que soporta el agitador, cuyo valor se calcula a través de la Ecuación 21.

$$h_e = H - C \quad (21)$$

$$h_e = 1563,19 - 521,06 = 1042,13 \text{ mm}$$

Para hallar el volumen total del agitador se tiene en cuenta que está compuesto por el eje y el disco con las palas, es decir, que se calcula como la suma de los volúmenes de ambas partes (Ecuaciones 22 y 23).

$$V_{turbina} = a \cdot h \cdot \frac{h}{4} \cdot n + \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot \frac{h}{4} \quad (22)$$

$$V_{turbina} = 130,27 \cdot 104,21 \cdot \frac{104,21}{4} \cdot 6 + \pi \cdot \frac{390,75^2}{4} \cdot \frac{104,21}{4} = 5262244,29 \text{ mm}^3$$

$$V_{turbina} = 0,005 \text{ m}^3$$

$$V_{eje} = \pi \cdot \frac{a^2}{4} \cdot h_e \quad (23)$$

$$V_{eje} = \pi \cdot \frac{130,27^2}{4} \cdot 1042,13 = 555549797,3 \text{ mm}^3$$

$$V_{eje} = 0,014 \text{ m}^3$$

$$V_{agitador} = V_{turbina} + V_{eje} = 0,005 + 0,014 = 0,019 \text{ m}^3$$

Considerando el medio al que estará expuesto el agitador, todos los componentes en el interior del biorreactor serán de acero inoxidable 316L por sus capacidades de resistencia a la corrosión, los ambientes húmedos, las bajas y altas temperaturas. En cambio, para la estructura exterior que soporta al conjunto agitador utiliza acero al carbono previamente galvanizado.

Para que el proceso de agitación sea eficaz, el volumen del fluido agitado debe ser capaz de llegar hasta las partes más lejanas del reactor, donde la velocidad de circulación no es el único factor importante, sino que la turbulencia del fluido puede llegar a determinar la eficacia de la operación. Todos estos parámetros consumen energía y por lo tanto es de gran importancia conocer la potencia consumida con el fin de cumplir los objetivos deseados. Se puede conocer la potencia consumida por el agitador relacionando por medio de gráficos (Figura 31) el número de Reynolds (Re) y el número de potencia (N_P).

Las letras S₁, S₂, S₃, etc., del gráfico muestran la relación de las medidas principales del impulsor y el reactor:

$$S_1 = D/T \quad S_2 = C/D \quad S_3 = a/D \quad S_4 = h/D \quad S_5 = w/T \quad S_6 = H/T$$

La curva A se utiliza para palas verticales del impulsor, la curvas B y C para palas verticales y estrechas, y la curva D para un reactor sin placas deflectoras.

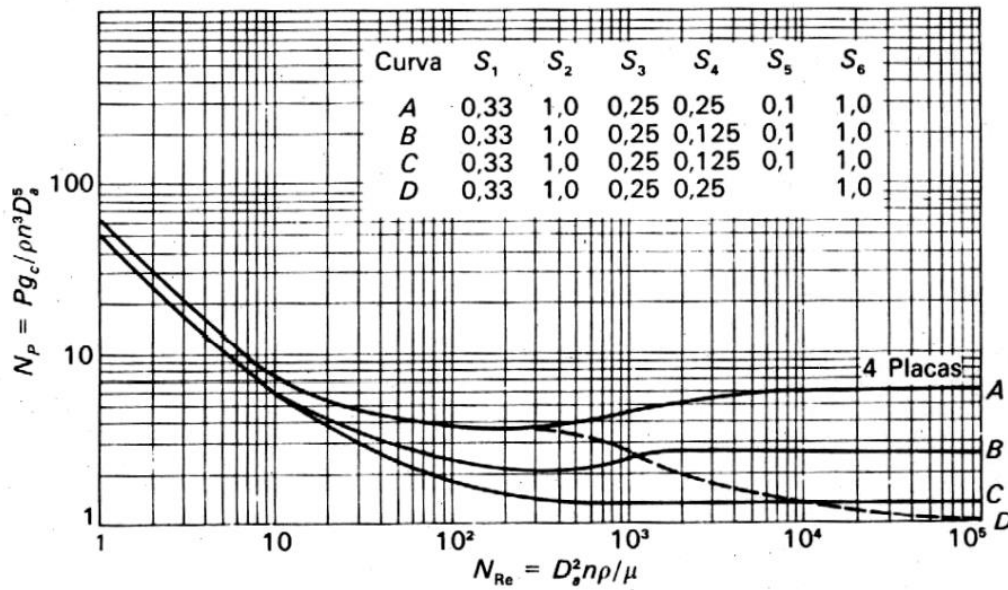


Figura 31. Gráfico que relaciona el número de Reynolds (N_{Re}) con el número de potencia (N_p) para turbina de 6 palas (Castillo, 2013).

Primero se calcula el número de Reynolds (Ecuación 24) y después el número de potencia interpolando en el gráfico de la Figura 31.

$$Re = \frac{\rho \cdot N_R \cdot D^2}{\mu} \quad (24)$$

Donde:

- ρ es la densidad de la mezcla, se asume la del H_2O a 25 °C (997 kg/m³).
- μ es la viscosidad de la mezcla (0,891 · 10⁻³ kg/m · s)
- N_R es la velocidad de rotación del impulsor (s⁻¹), el proceso de estudio se lleva a cabo a 150 rpm que corresponde con 2,5 s⁻¹.
- D es el diámetro del impulsor (m).

$$Re = \frac{997 \cdot 2,5 \cdot 1,56^2}{0,891 \cdot 10^{-3}} = 759334,11$$

Para un valor de Reynolds superior a 10^5 , y haciendo uso de la curva A, se obtiene un número de potencia igual a 6. Ahora, se calcula la potencia consumida sin tener en cuenta la aireación (Ecuación 11).

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 \quad (11)$$

$$P = 6 \cdot 997 \cdot 2,5^3 \cdot 0,521^5 = 3588,02 \text{ W} = 3,59 \text{ kW}$$

El sistema requiere un aporte de oxígeno mediante aireación, ya que la solubilidad del oxígeno en el medio de fermentación es muy baja y su demanda es alta. Se utilizarán difusores de boquilla porque causan poca pérdida de carga, difícilmente se bloquea y su limpieza es fácil.

Según las referencias bibliográficas el caudal de aire debe permanecer en torno a 1 vvm, que con el volumen de trabajo equivale a un caudal de aire de $6750 \text{ m}^3/\text{h}$.

$$Q_a = 1 \text{ vvm} \cdot 3,75 \text{ m}^3 \cdot \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}} = 225 \frac{\text{m}^3}{\text{h}}$$

Una vez conocida la potencia de agitación sin aireación y el caudal de aire necesario para un aporte de oxígeno suficiente, se procede al cálculo de la potencia de agitación con aireación (Ecuación de Michel y Miller: Ecuación 12) y del coeficiente global de transferencia de oxígeno, K_{La} (Ecuación de Blanch y Clark: Ecuación 13).

$$P_g = \left(\frac{P^2 \cdot N \cdot D^3}{Q_a^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (12)$$

$$P_g = \left(\frac{3588,02^2 \cdot 2,5 \cdot 0,521^3}{0,0625^{0,56}} \right)^{0,45} = 1995,28 \text{ W} \cong 2 \text{ kW}$$

$$K_{La} = 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} \cdot V_s^{0,7} \quad (13)$$

$$V_s = \frac{Q_a}{\text{Área}} = \frac{Q_a}{\pi \cdot \frac{D^2}{4}} = \frac{0,0625}{\pi \cdot \frac{0,521^2}{4}} = 0,29 \frac{m}{s}$$

$$K_L a = 2,6 \cdot 10^{-2} \cdot \left(\frac{1995,28}{3,75} \right)^{0,4} \cdot 0,29^{0,7} = 0,11 s^{-1} = 383,92 h^{-1}$$

E) Medidas reales del biorreactor

Se obtiene el volumen de la carcasa y de las dos tapas a partir de la capacidad total del reactor (Ecuación 25), que como se ha determinado en el Anexo V es de 5 m³.

$$V_r = V_{carcasa} + 2 \cdot V_{pestaña} + 2 \cdot V_f \quad (25)$$

$$V_{carcasa} = V_r - 2 \cdot V_{pestaña} - 2 \cdot V_f$$

Donde:

$$V_{pestaña} = \pi \cdot \frac{T^2}{4} \cdot h = \pi \cdot \frac{1563,19^2}{4} \cdot 28 = 53736756,46 mm^3 = 0,054 m^3$$

$$V_f = 0,13 \cdot T^3 = 0,5 m^3$$

$$V_{carcasa} = 5 - 2 \cdot 0,054 - 2 \cdot 0,5 = 1,95 m^3$$

La altura total del reactor se obtiene a partir de la Ecuación 26:

$$H_r = H_{carcasa} + 2 \cdot H \quad (26)$$

La altura de la carcasa se calcula con la relación establecida en el Anexo II:

$$\frac{H_{carcasa}}{T} = 1,25 \rightarrow H_{carcasa} = 1,25 \cdot T = 1,25 \cdot 1,56 = 1,95 m$$

Por tanto, la altura del reactor es:

$$H_r = 1,95 + 2 \cdot 0,34 = 2,63 m$$

F) Peso del biorreactor

El valor del peso del reactor viene dado por la Ecuación 14.

$$P_r = P_{vacío} + P_{contenido} + P_{agitador} \quad (14)$$

En primer lugar, se calcula el valor del peso del reactor vacío, que es la suma de cada una de las partes del reactor (carcasa y tapas: Ecuaciones 27, 28 y 29). El valor de la densidad del acero seleccionado (austenítico 316L) es de 7960 kg/m³.

(27)

$$P_{carcasa} = \pi \cdot R_i^2 \cdot H_{carcasa} \cdot t \cdot \rho_{acero} = \pi \cdot 0,782^2 \cdot 1,95 \cdot 0,006 \cdot 7960 = 178,92 \text{ kg} \quad (28)$$

$$P_{fondo} = 2 \cdot \pi \cdot R_i^2 \cdot t \cdot \rho_{acero} = 2 \cdot \pi \cdot 0,782^2 \cdot 0,008 \cdot 7960 = 244,68 \text{ kg} \quad (29)$$

$$P_{pestaña} = \pi \cdot R_i^2 \cdot f \cdot t \cdot \rho_{acero} = \pi \cdot 0,782^2 \cdot 0,301 \cdot 0,008 \cdot 7960 = 27,62 \text{ kg}$$

$$P_{vacío} = P_{carcasa} + 2 \cdot P_{fondo} + 2 \cdot P_{pestaña}$$

$$P_{vacío} = 178,92 + 2 \cdot 244,68 + 2 \cdot 27,62 = 723,52 \text{ kg}$$

Al peso del reactor vacío calculado se le suma un 10%, que corresponde con al peso de accesorios. Finalmente, el peso del reactor vacío es:

$$P_{vacío} = 795,87 \text{ kg}$$

A continuación, se calcula el peso del contenido del reactor, el cual se obtiene a partir de la densidad del contenido, que se toma como si fuese agua ($\rho_{agua} = 997 \text{ kg/m}^3$).

$$P_{contenido} = V \cdot \rho_{agua} = 3,75 \cdot 997 = 3738,75 \text{ kg}$$

Por último, se calcula el peso del agitador:

$$P_{agitador} = V_{agitador} \cdot \rho_{acero} = 0,019 \cdot 7960 = 151,24 \text{ kg}$$

Una vez calculados el peso de cada parte, se obtiene el peso total del reactor cargado:

$$P_r = 723,52 + 3738,75 + 151,24 = 4685,86 \text{ kg} \cong 4,7 \text{ Tn}$$

G) Soporte del biorreactor

Una vez conocidas las dimensiones del biorreactor, al tratarse de un recipiente vertical cuyo fondo no es plano, se selecciona el método de sujeción al suelo para mantenerlo en su posición. A continuación, se exponen las características principales de los dispositivos de apoyo para recipientes verticales con el objetivo de elegir el que más se ajusta a los requerimientos del reactor (estrucplan, 2012):

- Patas: el recipiente se apoya en 3 o 4 patas soldadas a la cubierta y fijadas al suelo por un perno de anclaje que resiste las cargas de tracción. Estas patas son perfiles en L-U-I soldados por encima de la línea de soldadura: directamente a la cubierta si está fabricada de acero al carbono y es de pequeño peso, o a una placa de refuerzo soldada sobre el recipiente para cubiertas en acero aleado o recipientes de gran peso. En el último caso, el material de la placa es igual al de la cubierta y las patas son de acero al carbono.

Este tipo de sujeción se utiliza en recipientes de menos de 5 m de altura y diámetros no superiores a 2,4 m, siempre que el peso no sea muy grande, en cuyo caso se utilizará como apoyo el faldón cilíndrico.

- Faldón cilíndrico o cónico: este tipo de apoyo se utiliza en los recipientes que debido a su tamaño o a tener que transmitir grandes esfuerzos no pueden ser soportados por patas. Los faldones cilíndricos consisten en un cilindro soldado al fondo cuyo diámetro medio coincide con el diámetro medio de la cubierta y cuyos pernos de anclaje se sitúan a lo largo del perímetro de la circunferencia de apoyo a una distancia entre 400 y 600 mm, según el tamaño y el número requerido (múltiplo de 4: 4, 8, 12, 20, 24). Si el número de pernos no cabe en la circunferencia del faldón, se realiza un faldón cónico que aumenta el tamaño de esta. El semiángulo del cono no debe ser mayor a 6 °.

Al diseñar los faldones se debe tener en cuenta que hay que incluir un acceso a su interior (dimensiones mínimas de 600 mm de diámetro) y unas ventilaciones para evitar la acumulación de gases en su parte interna.

- Ménsulas: se emplea en recipientes verticales que deben soportarse en estructuras portantes, cuando las dimensiones y cargas no son muy grandes. El número de ménsulas utilizadas normalmente son 2, 4 y 8; y al igual que las patas, pueden ser soldadas directamente a la cubierta o a una placa de refuerzo soldada al recipiente.

En este caso, el biorreactor mide de menos de 5 m de altura y tiene un diámetro inferior a 2,4 m pero superior a 0,75 m, por lo que el método de sujeción seleccionado son 4 patas de perfil IPN (doble T) comercial L, construidas con acero al carbono, excepto la placa que sujeta al biorreactor que será del mismo material que este, es decir, de acero inoxidable 316L.

H) Prueba hidráulica

Antes de poner en funcionamiento el biorreactor se debe llevar a cabo una prueba hidráulica para comprobar el funcionamiento del mismo en caso de que se alcance una presión más alta que la de diseño. Para ello, se calcula el valor de la presión hidráulica mínima mediante la Ecuación 30 donde σ_a es la tensión máxima admisible a la temperatura de diseño y σ la tensión máxima admisible a temperatura ambiente.

$$P_{h,min} = 1,5 \cdot P_d \cdot \frac{\sigma_a}{\sigma} \quad (30)$$

Considerando que el valor de ambas tensiones máximas admisibles coincide:

$$P_{h,min} = 1,5 \cdot P_d = 1,5 \cdot 3,5 = 5,25 \frac{kg}{cm^2}$$

Anexo VII. Diseño del extractor de aceite

La biomasa pretratada se somete a una extracción sólido-líquido con el objetivo de conseguir una corriente de aceite crudo con alta concentración de DHA. Para este proyecto se ha optado por un equipo continuo de disposición horizontal tipo de Smet (Figura 13), donde el material sólido se transporta en bandejas y se pone en contacto con el solvente en contracorriente.

La corriente de salida formada por el sólido agotado, en este caso la biomasa desaceitada, se denomina “refinado” y la formada por el soluto y el disolvente, en este caso los PUFA omega-3 y el hexano, “extracto” o “miscela” (Durán García & Ruiz Navas, 2015; Expósito, 2013).

El equipo será dimensionado para dar el tiempo necesario para que se produzca el contacto íntimo entre el soluto y el disolvente, así como la penetración y percolación del mismo en la materia prima.

Para los cálculos de esta etapa se consideran las siguientes suposiciones:

- Flujo en contracorriente de sólido y miscela.
- Equipo alimentado por hexano puro inicialmente.
- Temperatura constante y uniforme a lo largo del equipo (60 °C).
- Cada etapa teórica se considera como un mezclador que alcanza el equilibrio.
- La miscela que percola en cada etapa lo hace a una velocidad constante.
- El inerte (biomasa desaceitada) es totalmente inmiscible en el disolvente y por tanto saldrá por la corriente de sólido.
- Retención de disolvente en el refinado constante a lo largo del proceso, con un valor de 0,3.

La Figura 32 muestra un esquema del proceso de extracción con flujos en contracorriente.

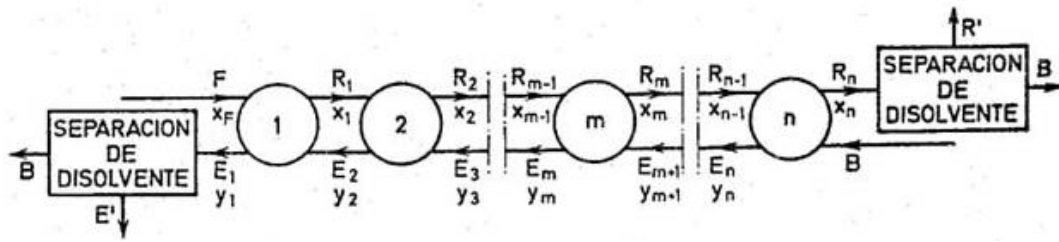


Figura 32. Disposición de flujos en el proceso de extracción.

Los balances de materia del sistema se definen en las Ecuaciones 15 y 16:

- Balance global:

$$F + B = E_1 + R_n \quad (15)$$

- Balance al soluto (S):

$$E_1 \cdot y_1 = R_n \cdot x_n = F \cdot x_F \quad (16)$$

Donde:

- F es la corriente másica de alimentación (kg/h).
- B es la corriente másica de disolvente (kg/h).
- E₁ es la corriente másica de miscela (extracto) de salida (kg/h).
- R_n es la corriente másica de sólido (refinado) de salida (kg/h).
- y₁ es la concentración másica de la corriente de miscela de salida.
- x_n es la concentración másica de la corriente de sólido de salida.

- x_F es la concentración másica de la alimentación.

Partiendo de los valores conocidos de F y x_F , y de la suposición de que el rendimiento global del aceite debe ser como mínimo de 95%, se resuelven las dos incógnitas principales: cantidad de disolvente necesaria para llevar a cabo la separación y número de etapas para ello, mediante los balances de materia definidos anteriormente junto con la curva de retención (Ecuación 17).

$$\text{Curva de retención} = cte = \frac{x_S + x_D}{x_I} = 0,3 \quad (17)$$

$$F = D \cdot V_{\text{útil}} = 0,165 \cdot 3,5 = 0,5775 \frac{m^3}{h} \cdot 114,64 \frac{kg}{m^3} = 66,2 \frac{kg}{h}$$

$$\frac{17,2 \frac{kg \text{ de DHA}}{m^3}}{114,64 \frac{kg \text{ de biomasa}}{m^3}} = 0,15 \frac{kg \text{ de DHA}}{kg \text{ de biomasa}}$$

Se comienza a resolver el balance para 2 etapas, y así sucesivamente hasta que se cumpla que la fracción de salida de aceite residual sea igual o inferior al 5% de la que entró al extractor (Tabla 21).

Tabla 21. Balance de materia para 2 etapas ideales.

2 etapas	Parámetro	Ud	F	E ₁	R ₂	B
DHA	Caudal	kg/h	9,93	9,42	0,49	0,00
	x	%	15,00	4,93	0,67	0,00
Hexano	Caudal	kg/h	0,00	181,73	16,39	198,60
	x	%	0,00	95,07	22,41	100,00
Biomasa desaceitada	Caudal	kg/h	56,27	0,00	56,27	0,00
	x	%	85,00	0,00	76,92	0,00
Total	Caudal	kg/h	66,20	191,15	73,15	198,60

Finalmente, resulta que para 2 etapas de equilibrio (n=2), la concentración de salida de aceite residual en el sólido sería de 4,93%.

$$x_2 = \frac{0,49}{9,93} \cdot 100 = 4,93\%$$

Como el resultado es menor del 5%, se determina que con dos etapas ideales se consigue el rendimiento deseado. Además, la referencia existente para hexano como disolvente en extractores industriales es que a partir de una relación 1:18 el rendimiento casi no cambia, y en este caso la relación alimentación:disolvente es 1:3 por lo que se encuentra dentro de los límites recomendados:

$$\frac{66,2}{198,6} = \frac{1}{3}$$

Con estos valores se procede al cálculo de la producción anual de DHA que se obtendría tras la extracción, y de la concentración de esta por kg de biomasa:

$$\text{Producción anual} = 9,5 \frac{\text{kg de DHA}}{h} \cdot 8400 \frac{h}{\text{año}} = 79800 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{año}}$$

$$50 \frac{Tn}{\text{año}} < 79,8 \frac{Tn}{\text{año}}$$

$$Y_{P/X} = \frac{9,5 \text{ kg de DHA}}{66,2 \text{ kg de biomasa}} = 0,14 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{kg de biomasa}}$$

$$0,005 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{kg de biomasa}} < 0,14 \frac{\text{kg de DHA}}{\text{kg de biomasa}}$$

Se confirma que tanto la producción anual como la concentración de DHA por kg de biomasa obtenidas superan a la fijadas como objetivo, así que el proceso se da como válido. Por último, se procede al cálculo de la longitud del extractor con la Ecuación 18:

$$L = \frac{1}{P \cdot W} \sum_{i=1}^N Q_i \quad (18)$$

Donde:

- L es la longitud efectiva del equipo (m).
- P es el ratio de percolación ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}$). Para este tipo de equipos industriales suele considerarse $4 \text{ m}^3/\text{m}^2\text{s}$.
- W es la longitud de cada etapa (m). Para este tipo de equipos industriales suele considerarse 0,6 m.
- Qi es el caudal volumétrico de la corriente (m^3/h).

$$L = \frac{1}{4 \cdot 0,6} \sum_{l=1}^2 \frac{66,2 \frac{\text{kg}}{\text{h}}}{114,64 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}} = 0,48 \text{ m}$$

Con estas condiciones, la longitud del extractor será de 0,5 metros aproximadamente.

Anexo VIII. Estudio de seguridad y salud en la obra

1. Objeto de estudio

El presente Estudio de seguridad y salud ha sido redactado según el artículo 6 del Real Decreto 1627/1997 de obligatoriedad de la Inclusión en un Estudio de Seguridad e Higiene en el Trabajo de los Proyectos de Edificación.

Se identificarán los diferentes riesgos que pueden aparecer durante la ejecución del Proyecto y se procurará proporcionar medidas técnicas para evitarlos.

2. Descripción y emplazamiento de la obra

La ubicación propuesta para la ejecución de la obra es la Planta Industrial de Arcos de la Frontera (Cádiz) de AlgaEnergy e Iberdrola, cuyo objetivo es la producción industrial de microalgas con destino comercial y la biofijación del CO₂ procedente de la Central de Ciclo Combinado de Iberdrola. Este emplazamiento cumple las condiciones básicas necesarias:

- Accesos a la obra.
- Topografía del terreno.
- Edificaciones colindantes.
- Suministros de agua.
- Edificaciones.
- Sistemas de saneamiento.
- Servidumbre y condicionantes.

3. Instalaciones provisionales y asistencia sanitaria

La obra deberá contar con los siguientes servicios higiénicos, por duplicado para poder usarse de forma simultánea por empleados de distinto género:

- Vestuarios con bancos y taquillas individualizadas, cada una con su llave.

- Espejos y lavabos con agua fría y caliente.
- Duchas con agua caliente y fría.
- Retretes.

Los empleados deben tener formación suficiente en primeros auxilios, el contratista debe asegurarse de ello; y en el lugar de trabajo debe haber como mínimo un botiquín portátil de primeros auxilios, de acuerdo con el apartado A3 del Anexo VI del R.D 486/1997, de 14 de Abril, “todo lugar de trabajo deberá disponer, como mínimo, de un botiquín portátil que contenga desinfectantes y antisépticos autorizados, gasas estériles, algodón hidrófilo, venda, esparadrapo, apósitos adhesivos, tijeras, pinzas y guantes desechables”.

4. Maquinaria de obra

La maquinaria debe utilizarse siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante y, en su caso, las que se indican en este estudio. Para este tipo de obra, normalmente se usa la siguiente maquinaria:

- Grúas.
- Hormigoneras.
- Montacargas.
- Maquinaria para mover tierra.
- Cabestrantes mecánicos.
- Sierra radial.
- Camiones.

Todos los trabajadores que utilicen dicha maquinaria están obligados a equiparse de los Equipos de Protección Individual (EPI) necesarios.

5. Medios auxiliares

Los principales medios auxiliares utilizados en una obra y algunas de sus particularidades son:

Andamios

Antes de utilizar andamios estos deben ser sometidos a una prueba de carga. Los pestillos de seguridad deben estar bien colocados; los pescantes preferiblemente serán metálicos; la barandilla de seguridad, la barra intermedia y el rodapié se colocarán en una disposición correcta; y todos los empleados que hagan uso de este medio están obligados a utilizar el cinturón de seguridad. La revisión de los cabestrantes se realizará de forma trimestral.

Escaleras de mano

Debe haber una separación adecuada sobre la pared en relación a la altura de la escalera y debe sobrar un metro de la misma sobre la superficie que se quiera salvar. Es recomendable usar zapatos antideslizantes.

Instalación eléctrica

Debe estar formada por un cuadro general, montado en una caja estancada con doble aislamiento y superando el metro de altura sobre el suelo. Los diferenciales serán de 0,3 V en las líneas de máquina y de 0,03 V en las líneas de alumbrado de tensiones mayores a 24 V.

6. Riesgos laborales evitables

Son aquellos riesgos que, tras implementar una medida correctiva, se evitan. Por ejemplo:

- Rotura de instalaciones: se neutralizarán las instalaciones existentes que no tengan una utilidad definida.

- Presencia de líneas de alta tensión o subterráneas: se provocará un corte en el suministro eléctrico y como medida de corrección se conectará la conexión a tierra.

7. Riesgos laborales no evitables

Son aquellos riesgos que, aunque están identificados, las técnicas de prevención y las protecciones solo puede reducir el riesgo de que se produzcan. Este tipo de riesgo pueden clasificarse en función de la fase de la obra en la que se puedan producir:

Producidos durante toda la obra y en cualquier lugar

- Caídas al mismo, o distinto, nivel de los trabajadores.
- Caídas de objeto sobre operarios.
- Choques contra objetos.
- Fuertes vientos.
- Contactos eléctricos de forma directa o indirecta.
- Cuerpos no identificados en los ojos.
- Sobreesfuerzos.

Las protecciones y medidas preventivas que se utilizarán de forma colectiva serán:

- Limpieza y orden de los lugares de trabajo.
- Despeje y limpieza de las vías de circulación de la obra.
- Iluminación suficiente y adecuada.
- Recubrimiento o distancia de seguridad de 1 metro de líneas eléctricas de baja tensión.

- Tomas a tierra para los cuadros, masas y máquinas sin doble aislamiento.
- No se permanecerá en el radio de acción de las máquinas.
- Señalización adecuada de la obra.
- Instalación de extintores de polvo seco de eficiencia 21A-113B.
- Grúa parada y en posición de veleta cuando haya vientos fuertes, y al final de la jornada.
- Evacuación de escombros.

Los operarios, durante esta fase, deberán llevar los siguientes EPI's:

- Casco de seguridad.
- Ropa de trabajo.
- Calzado de seguridad.
- Gafas de seguridad.

Riesgos producidos en la cimentación y en la estructura

- Atrapamiento y posibles aplastamientos.
- Atropellos, vuelcos y colisiones.
- Caída de materiales u operarios.
- Ambiente pulvígeno.
- Lesiones y cortes en manos, pies y piernas.

- Vibraciones.
- Dermatitis.
- Ruidos.
- Radiaciones y derivados por soldaduras.
- Electrocuciones.

Las medidas para prevenir y proteger a los empleados antes estos riesgos, son:

- Pasarelas.
- Andamios y plataformas para encofrados.
- Achiques de agua.
- Cabinas y pórticos de seguridad en las máquinas.
- Escaleras protegidas convenientemente.
- Escaleras de mano.
- Separación de la circulación de vehículos y operarios.
- Observación y vigilancia de estructuras colindantes.

Los trabajadores, durante esta fase, deberán hacer uso de los siguientes EPI's:

- Guantes de goma o cuero.
- Pantallas faciales y guantes para las soldaduras.
- Cinturones y arneses de seguridad.

- Protector de oídos.
- Botas de seguridad.

Riesgos durante la albañilería y el montaje de equipos

- Caída de operarios y de materiales.
- Lesiones y cortes en las extremidades.
- Electrocuciones.
- Inhalación de sustancias tóxicas.
- Quemaduras producidas por soldadura de materiales.
- Posibles proyecciones de partículas al cortar materiales.

Para prevenir estos riesgos se proponen las siguientes medidas:

- Redes verticales perimetrales colocadas adecuadamente y que se encuentren en buen estado. o Señalización de obstáculos.
- Redes de seguridad interiores y exteriores.
- Barandillas rígidas y resistentes con listón intermedio, además de rodapié.
- Evitar trabajos superpuestos.

Para este tipo de trabajo serán necesarios los mismos equipos de protección individual que en la categoría anterior, a falta, de cables fijadores.

Riesgos durante la fase de acabados

- Caídas de operarios y materiales.

- Ambiente pulvígeno.
- Dermatitis al estar en contacto con materiales.
- Inhalación de sustancias tóxicas.
- Lesiones y cortes en extremidades.
- Atrapamientos con o entre herramientas y objetos.
- Quemaduras.
- Electrocución.

Las medidas de prevención colectivas que pueden llevarse a cabo son:

- Ventilación adecuada y suficiente.
- Plataforma de carga y descarga del material.
- Barandillas.
- Se han de evitar ambientes inflamables.
- Se deben almacenar correctamente los materiales.

Los operarios deberán hacer uso de los siguientes EPI's:

- Guantes de cuero o goma.
- Botas de seguridad.
- Mascarilla filtrante.
- Pantallas faciales y guantes para las soldaduras.

- Cinturones y arneses de seguridad.

Riesgos durante la fase de instalación

- Lesiones y cortes en brazos, manos y pies.
- Dermatitis al estar en contacto con materiales que puedan provocarla.
- Inhalación de sustancias tóxicas.
- Electrocuciones.
- Golpes y aplastamientos de pies.
- Contactos eléctricos.
- Ambiente pulvígeno.

Para evitar estos riesgos, se llevarán a cabo las siguientes medidas de prevención:

- Se realizarán las conexiones eléctricas sin tensión.
- Se mantendrá una ventilación adecuada y suficiente.

Para proteger al operario, este deberá hacer uso de los siguientes EPI's:

- Guantes de cuero o goma.
- Botas de seguridad.
- Mascarilla filtrante.

8. Riesgos laborales especiales

A los riesgos enumerados anteriormente de diferente índole, hay que añadirle riesgos especiales para la seguridad y salud de los trabajadores que pueden darse en algunos trabajos durante la ejecución del Proyecto. Este tipo de riesgos están recogidos en el Anexo II del Real Decreto 1627/1997. A continuación, se exponen algunos de los posibles riesgos especiales que pueden surgir durante la obra:

- Exposición a agentes químicos o biológicos que pueden suponer un riesgo con una gravedad especial, o que sea obligada una vigilancia específica por ley. Como medidas para prevenir estos posibles riesgos, se recomiendan mantener un alto nivel de higiene, así como la prohibición de comer, beber o fumar durante la jornada de trabajo. De carácter individual, se tomarán medidas consideradas para la protección de las vías respiratorias y los ojos.
- Montaje y desmontaje de elementos prefabricados de gran peso, para evitarlos se limitará su ejecución a un área previamente señalizada.
- Realización de trabajos en las proximidades de líneas eléctricas de alta tensión, para evitarlos, se señalizará de forma adecuada la distancia de seguridad (5 metros), se montarán pórticos protectores de 5 metros de altura y se hará uso de calzado de seguridad.

9. Medidas de prevención especiales para el coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19)

Todas las empresas han de seguir las condiciones de seguridad y salud derivadas de la Ley de prevención de riesgos laborales y sus distintos reglamentos, pero para gestionar el riesgo de contagio por coronavirus SARS-CoV-2, las autoridades sanitarias competentes han elaborado una serie de protocolos recogidos por el Ministerio de Sanidad.

Con el Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo y la Ley 4/2021, de 12 de abril (ex Real Decreto-ley 10/2020, de 29 de marzo) quedaron suspendidas y/o modificadas muchas actividades. En la reanudación de dichas actividades, para reducir los contagios en el ámbito de trabajo, se han adoptado diferentes medidas de protección colectiva, la mayoría recogidas en el documento “Buenas prácticas en los centros de trabajo.

Medidas para la prevención de contagios del COVID-19”, publicado el 11 de abril de 2020. Algunas de ellas son:

- Instalar paneles informativos con recomendaciones básicas de prevención frente al contagio del coronavirus.
- Reorganización, cuando sea posible, para el acceso escalonado de los trabajadores a sus puestos de trabajo.
- Aumentar la ventilación natural y/o forzada.
- Incremento de la frecuencia de limpieza y desinfección de las instalaciones (oficinas, aseos, vestuarios, salas de reuniones, etc.). La limpieza se llevará a cabo también sobre las herramientas y equipos de trabajo de uso compartido.
- Disposición de una zona dotada de solución hidro-alcohólica y/o agua, jabón y papel secante para la desinfección de las manos.
- Mantener la distancia de seguridad interpersonal

10. Libro de incidencias

Según lo resuelto en el Artículo 13 del Real Decreto 1627/1997, de 24 de octubre, en cada centro de trabajo existirá un libro de incidencia a fin de controlar el seguimiento del plan de seguridad y salud establecido.

El coordinador en materia de seguridad y salud o, en su falta, la dirección facultativa, se hace cargo del libro de incidencias, el cual debe estar siempre en la obra. Contará con un duplicado de cada página, y tendrán acceso al mismo la dirección facultativa, los contratistas y subcontratistas, los trabajadores autónomos, los organismos o personas con responsabilidades en materia de prevención en las empresas intervinientes en la obra, los representantes de trabajadores y los técnicos de los órganos especializados en seguridad y salud en el trabajo de la Administraciones públicas competentes, además estos últimos podrán realizar anotaciones con los fines que al libro se le destinan.

Si se lleva a cabo una anotación, el coordinador está obligado a remitir en 24 horas una copia a la Inspección de Trabajo y Seguridad Social de la provincia donde se está ejecutando la obra. De la misma manera, se notificará la anotación al contratista y a los representantes de trabajadores.

11. Paralización de los trabajos

Según el artículo 14 del Real Decreto 1627/1997, cuando el coordinador en materia de seguridad y salud (o cualquier otra persona que integre la dirección facultativa) observe un incumplimiento de las medidas de seguridad y salud en el trabajo, advertirá al contratista de ello, dejando constancia del incumplimiento en el libro de incidencias y quedando facultado, para en caso de riesgo grave o inminente para la salud y seguridad de los trabajador, paralizar el trabajo o, si fuese necesario, la totalidad de la obra.

Si esto tuviera lugar, la persona que mande la paralización de la obra deberá dar cuentas a los efectos oportunos a la Inspección de Trabajo y Seguridad Social correspondiente, a los contratistas y subcontratistas, si los hubiera, y a los representantes de los trabajadores afectados por la paralización.

12. Normativa de seguridad e higiene aplicada a la obra

A continuación, se enumera la legislación en la que está basado el estudio de seguridad e higiene para la ejecución de la obra:

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 1627/1997, de 24 de octubre, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y de salud en las obras de construcción.
- Real Decreto 486/1997, de 14 de abril, sobre disposiciones mínimas en materia de señalización de seguridad y salud en el trabajo.
- Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual.

- Real Decreto 1644/2008, de 10 de octubre, por el que se establecen las normas para la comercialización y puesta en servicio de las máquinas.
- Real Decreto 1215/1997, de 18 de julio, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo.
- Real Decreto 39/1997, de 17 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención.
- Real Decreto 842/2002, de 2 de agosto, por el que se aprueba el Reglamento electrotécnico para baja tensión.
- Orden de 20 de septiembre de 1986 por la que se establece el modelo de libro de incidencias correspondientes a las obras en las que sea obligatorio un estudio de seguridad e higiene en el trabajo.
- Orden de 16 de diciembre de 1987 por la que se establecen modelos nuevos para la notificación de accidentes de trabajo y se dan instrucciones para su cumplimiento y tramitación.
- Ley 4/2021, de 12 de abril, por la que se regula un permiso para los trabajadores por cuenta ajena que no prestan servicios esenciales con el fin de reducir la movilidad de la población en el contexto de la lucha contra el COVID-19.0
- Nota informativa (24/04/2020) relativa a la incorporación en el plan de seguridad y salud en el trabajo de las medidas a adoptar en las obras de construcción frente al riesgo de contagio por coronavirus SARS-CoV-2.
- Guía de buenas prácticas en los centros de trabajo del 11 de abril de 2020.

Anexo IX. Estudio de seguridad en las unidades

Se considera que todos los equipos del proceso (elementos de seguridad, impulsores, motores, instrumentación, etc.) disponen de certificación y marcado CE.

1. Instrumentos de seguridad

Para asegurar que el proceso se lleve a cabo de forma segura el proceso se debe provisionar de provisiones instrumentadas de seguridad, como presostatos, sondas de temperaturas, alarmas de nivel, válvulas reguladoras u oxímetros.

2. Dispositivos de alivio de presión

Los dispositivos de liberación de presión aseguran que la presión en el interior de un reactor no alcance un nivel inseguro. Todos los reactores a presión dentro del ámbito de la Sección VIII del código ASME deben provisionarse con un dispositivo de este tipo.

Uno de los dispositivos de alivio de presión más utilizados son las válvulas de seguridad, sobre todo las de liberación de muelle. Estas se suelen complementar con discos de ruptura, que están diseñados para romperse si se excede la presión establecida, y se suelen utilizar antes que las válvulas para protegerlas de la corrosión y reducir las pérdidas debido a fugas.

3. Análisis de peligros y operabilidad (HAZOP)

El análisis de peligros y operabilidad (HAZOP) es una técnica que permite la evaluación cualitativa de los riesgos o problemas de operabilidad que aparecen como consecuencia de desviaciones de las condiciones de operación normales. Para su aplicación se parte de dos hipótesis:

- La instalación está bien diseñada, en relación con la experiencia, el conocimiento de los procesos implicados y la aplicación de las normas y códigos pertinentes.
- Los materiales de construcción han sido los adecuados y la construcción y el ensamblaje se han hecho correctamente.

HAZOP de biorreactor

Parámetro	Palabra guía	Causa/s	Consecuencia/s	Acción a tomar
Presión	Más	Fallo en la válvula de aporte de oxígeno	Aumento de presión que puede dar lugar a un incendio o una explosión	Instalar válvula de seguridad en el RTA, alarma en la sala de control y señal luminosa en el lugar
	Menos	Fallo en la válvula de aporte de oxígeno	Ralentización del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas	Alarma en la sala de control
Temperatura	Más	Velocidad elevada del impulsor	Ralentización o detención del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas y aumento de presión	Instalación de dos sondas de temperatura en los fondos, alarma en la sala de control y señal luminosa en el lugar
	Menos	Carga incorrecta de materias primas	Ralentización o detención del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de dos sondas de temperatura en los fondos y alarma en la sala de control

Línea de carga de materias primas				
Parámetro	Palabra guía	Causa/s	Consecuencia/s	Acción a tomar
Caudal	No	Bloqueo en la línea, fallo en la bomba de impulsión o en la válvula	Fugas y vertidos, detención del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación de los productos a zona segura
	Más	Fallo en la bomba de impulsión	Aumento de la cantidad de materia prima no alcanzando los valores definidos	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación de los productos a zona segura
	Menos	Fallo en la bomba de impulsión, bloque parcial en la línea o en la válvula	Ralentización o detención del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas, imposibilidad de bombear la materia prima o otros equipos del proceso	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación de los productos a zona segura
	Inverso	Fallo en la válvula de cierre	Efecto de succión debido al diferencial de presión entre el interior del reactor y el exterior	Instalación de una válvula antirretorno, alarma en la sala de control y señal luminosa en el lugar

HAZOP de extractor

Parámetro	Palabra guía	Causa/s	Consecuencia/s	Acción a tomar
Temperatura	Más	Carga incorrecta de alimentación o disolvente	Si supera la temperatura de ebullición del disolvente podría aumentar la presión y explotar	Instalación de sondas de temperatura, alarma en la sala de control y señal luminosa en el lugar
	Menos	Carga incorrecta de alimentación o disolvente	Pérdida de rendimiento en el proceso, con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de sondas de temperatura y alarma en la sala de control

Línea de carga de alimentación				
Parámetro	Palabra guía	Causa/s	Consecuencia/s	Acción a tomar
Caudal	No	Bloqueo en la línea, fallo en la bomba de impulsión o en la válvula	Fugas y vertidos, detención del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación de los productos a zona segura
	Más	Fallo en la bomba de impulsión	Fugas y vertidos, pérdida de rendimiento en el proceso, con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación de los productos a zona segura

	Menos	Fallo en la bomba de impulsión, bloque parcial en la línea o en la válvula	Fugas y vertidos, pérdida de rendimiento en el proceso, con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de caudalímetro y alarma en la sala de control y evacuación de los productos a zona segura
--	-------	--	---	--

Línea de carga de disolvente				
Parámetro	Palabra guía	Causa/s	Consecuencia/s	Acción a tomar
Caudal	No	Bloqueo en la línea, fallo en la bomba de impulsión o en la válvula	Fugas y vertidos, detención del proceso productivo con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación del disolvente a zona segura
	Más	Fallo en la bomba de impulsión	Fugas y vertidos, variación de rendimiento en el proceso	Instalación de caudalímetro y alarma en la sala de control y evacuación del disolvente a zona segura
	Menos	Fallo en la bomba de impulsión, bloque parcial en la línea o en la válvula	Fugas y vertidos, pérdida de rendimiento en el proceso, con sus respectivas pérdidas económicas	Instalación de caudalímetro, alarma en la sala de control y evacuación del disolvente a zona segura

Ficha de Datos de Seguridad

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Fecha de emisión: 18.02.2004
Reemplaza la emisión del 17.01.2003

1. Identificación de la sustancia o del preparado y de la sociedad o empresa

Identificación de la sustancia o del preparado

Artículo número: 104367

Denominación: n-Hexano p.a. ACS

Utilización de la sustancia/preparación

Análisis químico

Producción química

Denominación de la empresa

Empresa: Merck KGaA * 64271 Darmstadt * Alemania * Tel: +49 6151 72-2440

Teléfono de urgencias: Instituto Nacional de Toxicología * Madrid * Tel: 91 562 04 20

2. Composición/información sobre los componentes

Nr.-CAS: 110-54-3

Número de índice CE: 601-037-00-0

PM: 86.18 g/mol

Número CE: 203-777-6

Fórmula molecular: C₆H₁₄
(según Hill)

Fórmula química: CH₃(CH₂)₄CH₃

3. Identificación de peligros

Fácilmente inflamable. Irrita la piel. Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación. Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. Posible riesgo de perjudicar la fertilidad. Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar. La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigo.

4. Primeros auxilios

Tras inhalación: aire fresco. En caso necesario, respiración asistida o por medios instrumentales. Mantener libres las vías respiratorias. Llamar al médico.

Tras contacto con la piel: aclarar con abundante agua. Eliminar ropa contaminada. Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua, manteniendo abiertos los párpados. Llamar al oftalmólogo.

Tras ingestión: Evitar vómito. ¡Riesgo de aspiración! Mantener libres las vías respiratorias.

Aplicación posterior: Carbón activo (20-40g de suspensión al 10%). No administrar leche. No tomar alcohol. Llamar inmediatamente al médico.

Ficha de Datos de Seguridad Merck

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Artículo número: 104367
Denominación: n-Hexano p.a. ACS

5. Medidas de lucha contra incendios

Medios de extinción adecuados:
CO₂, espuma, polvo.

Riesgos especiales:
Combustible. Vapores más pesados que el aire. Son posibles mezclas explosivas con el aire a temperaturas normales. En caso de incendio posible formación de gases de combustión o vapores peligrosos.

Equipo de protección especial para el personal de lucha contra incendios:
Permanencia en el área de riesgo sólo con sistemas de respiración artificiales e independientes del ambiente. Protección de la piel mediante observación de una distancia de seguridad y uso de ropa protectora adecuada.

Referencias adicionales:
Evitar la penetración del agua de extinción en acuíferos superficiales o subterráneos.
Refrigerar los recipientes con rociado de agua desde una distancia segura.

6. Medidas a tomar en caso de vertido accidental

Medidas de precaución relativas a las personas:
Evitar el contacto con la sustancia. No inhalar los vapores/aerosoles. Proceder a ventilación en lugares cerrados.

Medidas de protección del medio ambiente:
No incorporar a la canalización del desagüe; ¡Riesgo de explosión!

Procedimientos de recogida/limpieza:
Recoger con materiales absorbentes, p. ej. con Chemisorb®. Proceder a la eliminación de los residuos. Aclarar.

7. Manipulación y almacenamiento

Manipulación:

Observaciones sobre la protección de incendios y explosiones:
Mantener alejado de fuentes de ignición. Evitar la carga electrostática.

Indicaciones para una manipulación segura:
Trabajar bajo vitrina extractora. No inhalar la sustancia. Evítese la generación de vapores/aerosoles.

Almacenamiento:

Bien cerrado, en lugar bien ventilado, alejado de fuentes de ignición y de calor. Temperatura de almacenamiento: sin limitaciones.

8. Controles de exposición/protección personal

Parámetros específicos de control:

CE

nombre	n-Hexano
fertilidad	R(F) 3: posiblemente perjudica la fertilidad en humanos

Ficha de Datos de Seguridad Merck

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Artículo número: 104367
Denominación: n-Hexano p.a. ACS

Protección personal:

Los tipos de auxiliares para protección del cuerpo deben elegirse específicamente según el puesto de trabajo en función de la concentración y cantidad de la sustancia peligrosa. Debería aclararse con el suministrador la estabilidad de los medios protectores frente a los productos químicos.

Protección respiratoria: necesaria en presencia de vapores/aerosoles. Filtro A.

Protección de los ojos: precisa

Protección de las manos: Para contacto pleno:

Guantes: Caucho nitrilo
Espesor: 0.40 mm
Tiempo de penetración: > 480 Min.

En caso de salpicaduras:

Guantes: Caucho nitrilo
Espesor: 0.11 mm
Tiempo de penetración: > 10 Min.

Los guantes de protección indicados deben cumplir con las especificaciones de la Directiva 89/686/EEC y con su norma resultante EN374, por ejemplo KCL 730 Camatril® -Velours (Sumerción), 740 Dermatril® (Salpicaduras). Los tiempos de ruptura mencionados anteriormente han sido determinados con muestras de material de los tipos de guantes recomendados en mediciones de laboratorio de KCL según EN374.

Esta recomendación solo es válida para el producto mencionado en la ficha de datos de seguridad, suministrado por nosotros y para el fin indicado. Al disolver o mezclar en otras sustancias y cuando las condiciones difieran de las indicadas en EN374, debe dirigirse al suministrador de guantes con distintivo CE (por ejem. KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Internet: www.kcl.de)

Medidas de higiene particulares:

Sustituir inmediatamente la ropa contaminada. Protección preventiva de la piel. Lavar cara y manos al término del trabajo. Trabajar bajo vitrina extractora. No inhalar la sustancia.

9. Propiedades físicas y químicas

Estado físico:	líquido		
Color:	incoloro		
Olor:	a gasolina		
Valor pH		no aplicable	
Viscosidad dinámica	(20 °C)	0.326	mPa*s
Viscosidad cinemática	(20 °C)	0.50	mm ² /s
Punto de fusión		-94.3	°C
Punto de ebullición	(1013 hPa)	69	°C
Temperatura de ignición		240	°C
Punto de inflamación		-22	°C c.c.
Límite de explosión	bajo	1.0	Vol%
	alto	8.1	Vol%
Presión de vapor	(20 °C)	160	hPa
Densidad de vapor relativa		2.79	
Densidad	(20 °C)	0.66	g/cm ³

Ficha de Datos de Seguridad Merck

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Artículo número: 104367
Denominación: n-Hexano p.a. ACS

Solubilidad en			
Agua	(20 °C)	0.0095	g/l
log P(oc/ag):		4.11	
Potencial de bioacumulación		242-453	

10. Estabilidad y reactividad

Condiciones a evitar

Calentamiento. ((riesgo de explosión!))

Materias a evitar

Riesgo de explosión con: oxidantes fuertes.

Productos de descomposición peligrosos

información no disponible

Información complementaria

fácilmente inflamable;
materiales inadecuados: plásticos diversos, goma.
En estado gaseoso/vapor existe riesgo de explosión con el aire.

11. Información toxicológica

Toxicidad aguda

LC₅₀ (inhalativo, rata): 48000 ppm(V) /4 h.
LD₅₀ (dérmica, conejo): >2000 mg/kg.
LD₅₀ (oral, rata): 28710 mg/kg.

Síntomas específicos en ensayos sobre animales:
Ensayo de irritación ocular (conejo): Irritaciones leves.

Toxicidad subaguda a crónica

Los experimentos con animales hacen sospechar que la sustancia puede afectar la capacidad reproductora también en humanos.

Mutagenicidad bacteriana: Salmonella typhimurium: negativa.

Ficha de Datos de Seguridad Merck

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Artículo número: 104367
Denominación: n-Hexano p.a. ACS

Informaciones adicionales sobre toxicidad

Tras inhalación: Irritaciones en las vías respiratorias. sueño, aturdido.
Tras contacto con la piel: Irritaciones. Riesgo de absorción por la piel.
Tras contacto con los ojos: Irritaciones leves. Riesgo de turbidez en la córnea.
Tras ingestión: náuseas. En caso de ingestión por error, la sustancia puede presentar peligro de aspiración. Si llega a los pulmones (¡vómito!) puede presentarse un estado análogo al de la pulmonía (neumonitis química). Tras ingestión, pueden quedar lesiones: pulmones.
Tras absorción: aturdido, cansancio, narcosis.
En caso de efecto prolongado del producto químico: efectos sobre el sistema nervioso central, parálisis.

Otras indicaciones:

Para hidrocarburos alifáticos con 6 - 18 átomos de carbono en general: por inhalación directa producen pulmonía y posibles edemas pulmonares. Estos efectos pueden darse aquí sólo bajo condiciones especiales (rociado, pulverización e inhalación de aerosoles e.o.). Tras absorción de muy elevadas cantidades, narcosis.

Información complementaria

El producto debe manejarse con las precauciones apropiadas para los productos químicos.

12. Informaciones ecológicas

Comportamiento en compartimentos ecológicos:
Posibilidad de concentración en organismos. BCF: 242-453.
Reparto: log P(oct): 4.11.
Es de esperar un notable potencial de bioacumulación (log P(o/w) >3).

Efectos ecotóxicos:
No miscible con agua.

Efectos biológicos:
Tóxico para organismos acuáticos. Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

Toxicidad para los peces: peces LC₅₀: 2.5-117 mg/l /96 h. C. auratus LC₅₀: 4 mg/l /24 h.
Toxicidad de dafnia: Daphnia magna CE₅₀: 2.1 mg/l /48 h.
Toxicidad para las algas: Chlorella vulgaris CI₅₀: 1079 mg/l /96 h.

Otras observaciones ecológicas:
DBO₅: 2.21 g/g.
DQO: 0.04 g/g.
ThOD: 3.52 g/g.

¡No incorporar a suelos ni acuíferos!

13. Consideraciones relativas a la eliminación

Producto:

Los productos químicos han de eliminarse siguiendo las normativas nacionales. Bajo www.retrologistik.de encontrará indicaciones sobre países, indicaciones específicas de productos así como contactos.

Embalaje:

Los envases de productos Merck han de eliminarse siguiendo las normativas nacionales. Bajo www.retrologistik.de encontrará indicaciones especiales para las peculiaridades nacionales así como contactos

Ficha de Datos de Seguridad Merck

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Artículo número: 104367
Denominación: n-Hexano p.a. ACS

14. Información relativa al transporte

Transporte terrestre ADR, RID
UN 1208 HEXANE, 3, II

Transporte fluvial ADN, ADNR no ensayado

Transporte marítimo IMDG-Code
UN 1208 HEXANES, 3, II
EmS: F-E S-D

Transporte aéreo CAO, PAX
HEXANES, 3, UN 1208, II

Las informaciones relativas al transporte se mencionan de acuerdo a la reglamentación internacional y en la forma como se aplican en Alemania. Pueden existir posibles diferencias a nivel nacional en otros países comunitarios.

15. Información reglamentaria

Etiquetado según Directivas de la CEE

Pictograma:	F	Fácilmente inflamable
	Xn	Nocivo
	N	Peligroso para el medio ambiente

Frases R:	11-38-48/20-51/53-62-65-67	Fácilmente inflamable. Irrita la piel. Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación. Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. Posible riesgo de perjudicar la fertilidad. Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar. La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigo.
-----------	----------------------------	---

Frases S:	9-16-29-33-36/37-61-62	Manténgase el recipiente en lugar bien ventilado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar. No tirar los residuos por el desagüe. Evítese la acumulación de cargas electrostáticas. Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados. Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad. En caso de ingestión no provocar el vómito: acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.
-----------	------------------------	--

Número CE:	203-777-6	Etiquetado CE
------------	-----------	---------------

Etiquetado reducido(1999/45/CE,art.10,4)

Pictograma:	F	Fácilmente inflamable
	Xn	Nocivo
	N	Peligroso para el medio ambiente

Frases R:	48/20-62-65	Nocivo: riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación. Posible riesgo de perjudicar la fertilidad. Nocivo: si se ingiere puede causar daño pulmonar.
-----------	-------------	---

Frases S:	36/37-62	Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados. En caso de ingestión no provocar el vómito: acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.
-----------	----------	--

Ficha de Datos de Seguridad Merck

Conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión

Artículo número: 104367
Denominación: n-Hexano p.a. ACS

16. Otras informaciones

Razón de revisión

Cambio/completado en el capítulo 10.
Cambio en la clasificación de transportes.

Revisión general.

Representante regional:



VWR International S.L. * Apartado 48 * E-08100 Mollet del Valles * Tel.: +34 (0) 93 5655 500 *
Fax: +34 (0) 93 5440 000

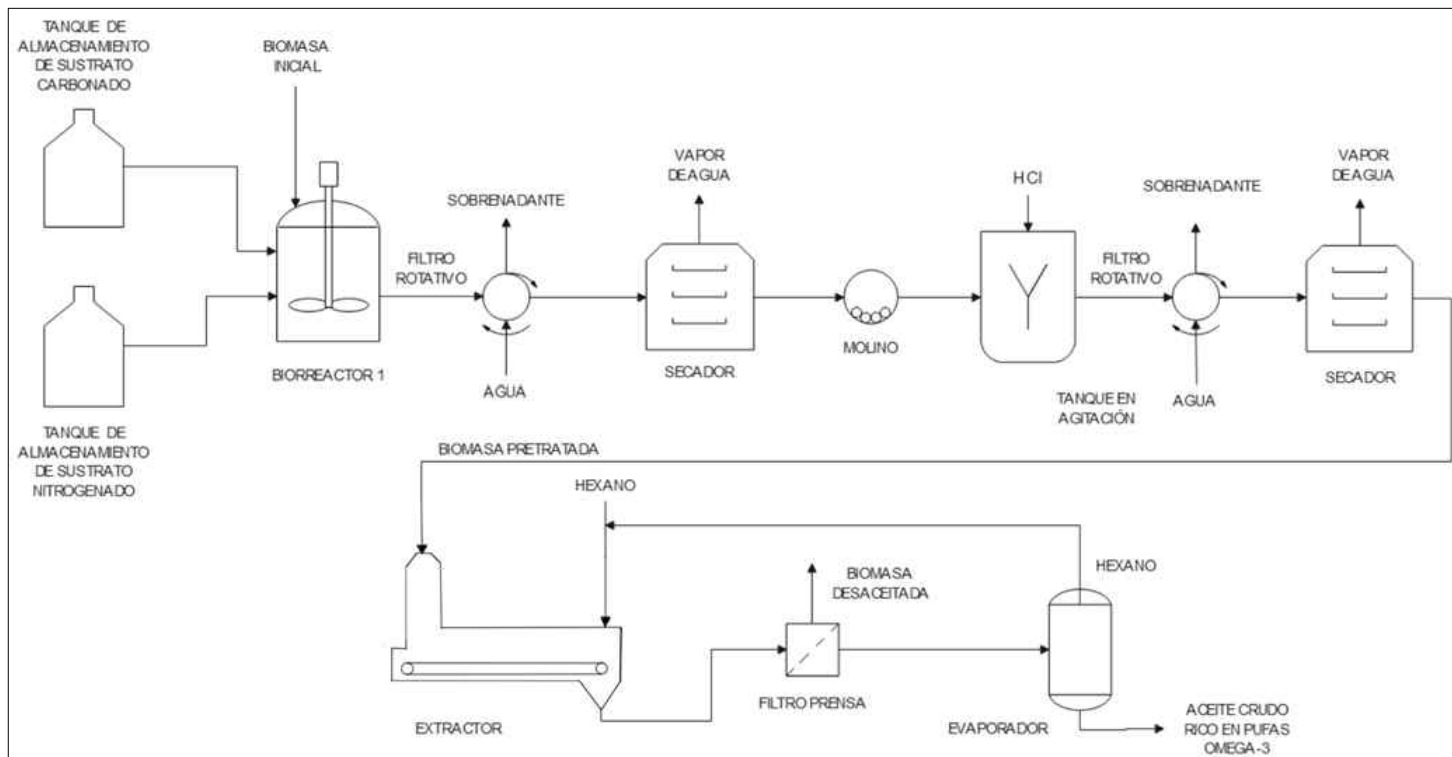
Merck Farma y Química, S.A. * Apartado 47 * E-08100 Mollet del Valles * Tel.: +34 (0) 93 5655 500
* Fax: +34 (0) 93 5440 000

Los datos suministrados en ésta ficha de seguridad se basan a nuestro actual conocimiento. Describen tan sólo las medidas de seguridad en el manejo de éste producto y no representan una garantía sobre las propiedades descritas del mismo.

Documento III: Planos



 UCA Universidad de Cádiz	UNIVERSIDAD DE CADIZ	
	Titulo del proyecto: Producción de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales	
	Situación del proyecto (36.673914, -5.819613)	Nº: 1
	Nombre: Blanca Ruiz Alonso	Escala: —
Firma: 		



UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Título del proyecto: Producción de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales

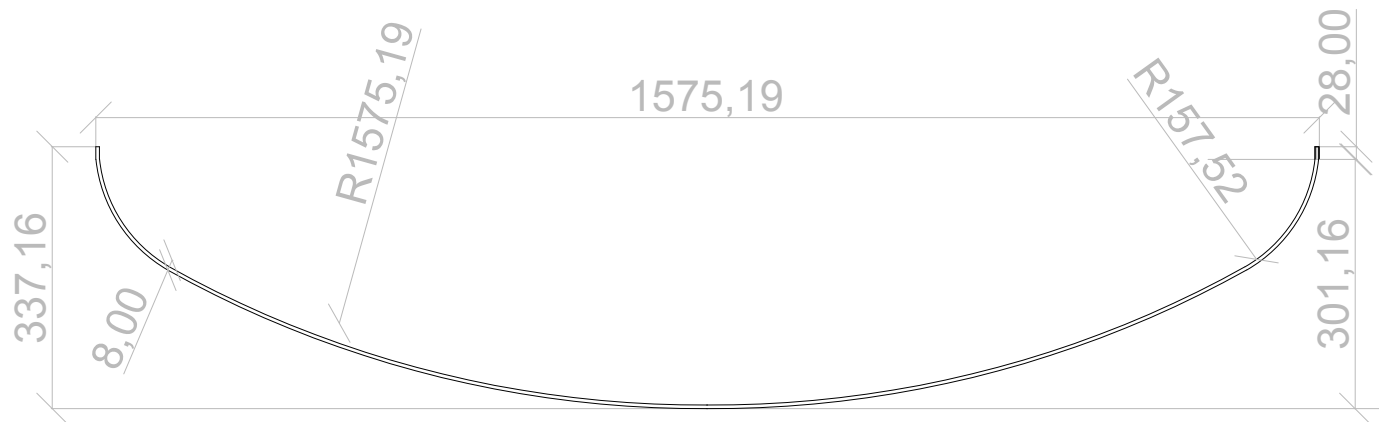
Diagrama de procesos



Nº: 2

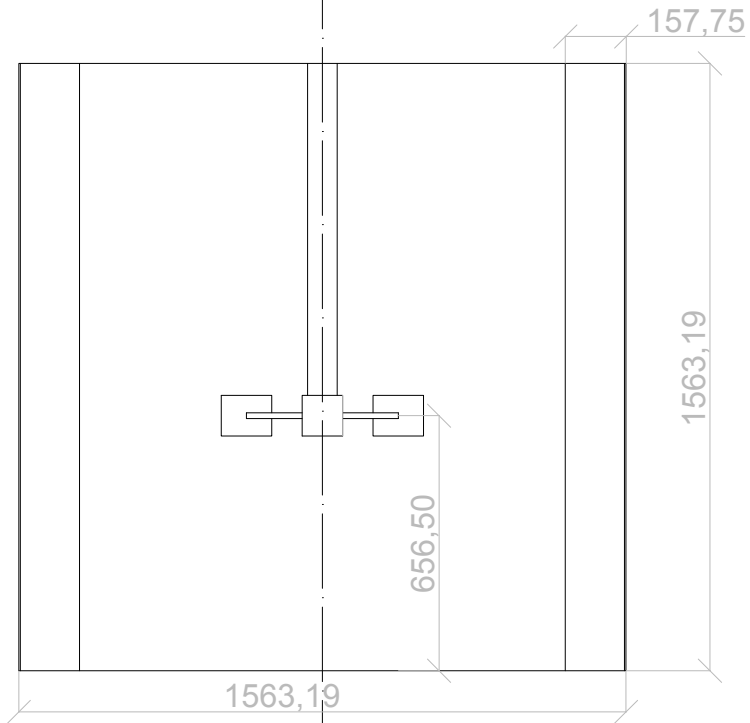
Nombre: Blanca Ruiz Alonso

Escala: —

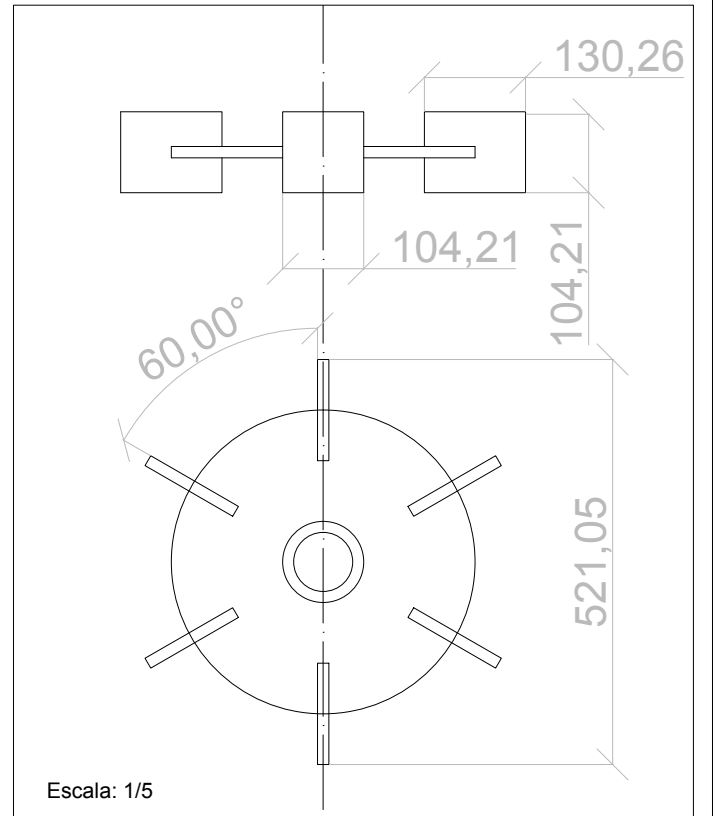
Firma:



 UCA Universidad de Cádiz	UNIVERSIDAD DE CADIZ	
	Titulo del proyecto: Producción de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales RTA: Fondo tipo Kloppe Nombre: Blanca Ruiz Alonso Firma: 	
	Nº: 3 Escala: 1/5	



Espesor de carcasa: 6 mm



Escala: 1/5



UNIVERSIDAD DE CADIZ

Titulo del proyecto: Producción de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales

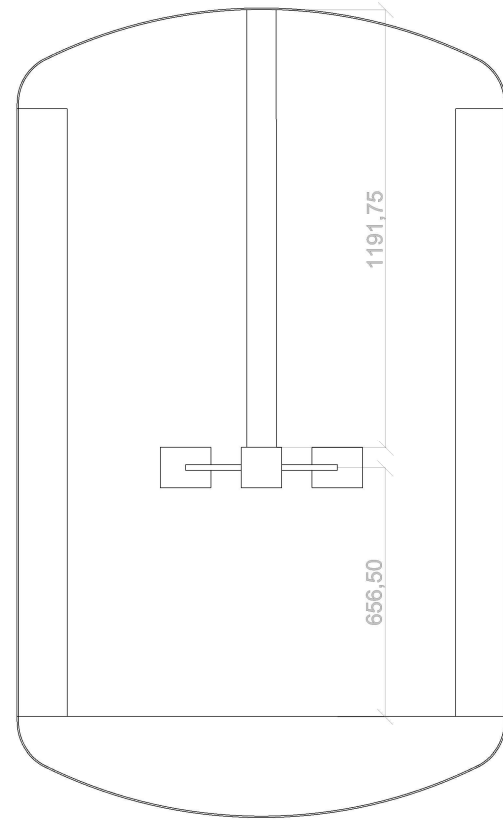
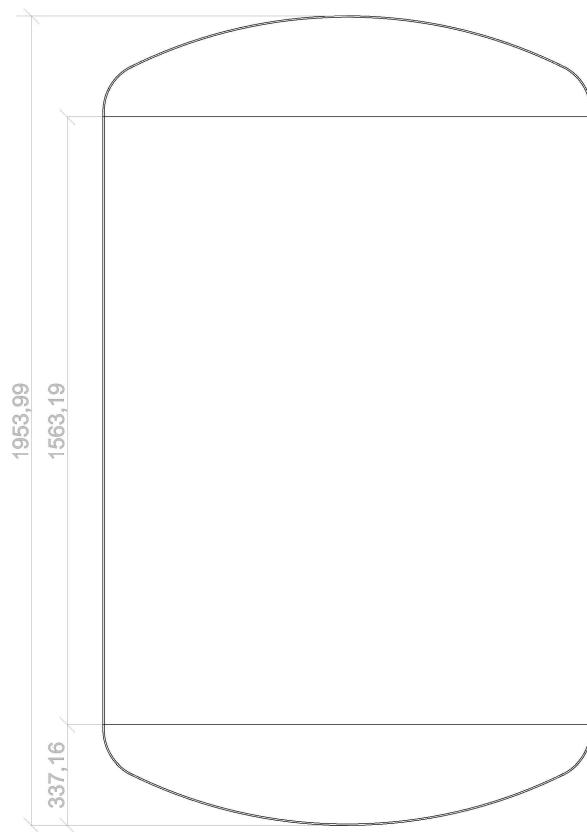
RTA: Parte central e impulsor Rushton de 6 palas


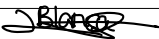
Nº: 4

Nombre: Blanca Ruiz Alonso

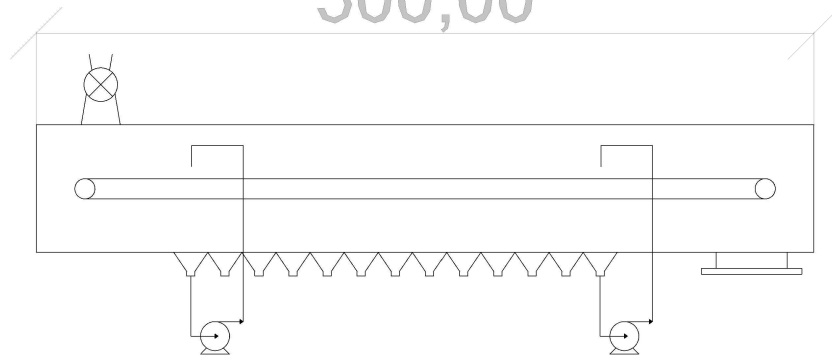
Escala: 1/10

Firma:



 UCA Universidad de Cádiz	UNIVERSIDAD DE CADIZ	
	Titulo del proyecto: Producción de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales	
	RTA: Vista general	Nº: 5
	Nombre: Blanca Ruiz Alonso	Escala: 1/10
	Firma: 	

500,00



UNIVERSIDAD DE CADIZ

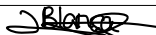
Titulo del proyecto: Producción de aceite rico en ácidos grasos Omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales

Sistema de extracción sólido-líquido

Nº: 6

Nombre: Blanca Ruiz Alonso

Escala: 1/3

Firma: 

Documento IV: Pliego de condiciones

Índice

1. Condiciones generales	151
1.1. Objetivo del Pliego de Condiciones	153
1.2. Normativa general	153
1.3. Documentos del Proyecto	154
2. Condiciones de índole facultativa	156
2.1. Disposiciones generales	156
2.2. Términos del Pliego de Condiciones	156
2.3. Dirección facultativa	157
2.4. Obligaciones y derechos del contratista	158
2.5. Obra y ejecución	159
2.5.1. Facultades de la dirección de obra	159
2.5.2. Libro de Órdenes	160
2.5.3. Inicio del trabajo	160
2.5.4. Replanteo	160
2.5.5. Ejecución de la obra	161
2.5.6. Maquinaria	161
2.5.7. Materiales	161
2.5.8. Pruebas de control de calidad y ensayos	162
2.5.9. Puesta a punto y pruebas de funcionamiento	162
2.5.10. Almacenamiento de materiales	163
2.5.11. Partidas de alzada	163
2.5.12. Recepción provisional de las obras	163
2.5.13. Periodo de garantías	163
2.5.14. Condición final de la obra	164
2.5.15. Recepción definitiva de las obras	164
3. Condiciones económicas	165
3.1. Condiciones generales	165
3.2. Fianzas	165
3.3. Precios	166
3.4. Valoración, medición y abono de los trabajos	169
3.5. Indemnizaciones	170
3.6. Seguros y conservación de la obra	171
4. Condiciones legales	172
4.1. Disposiciones legales	172
4.2. Contratista	173
4.3. Leyes laborales	173

4.4. Mano de obra.....	174
4.5. Daños en propiedades vecinas.....	174
4.6. Rescisión del contrato	174
4.7. Adjudicación	175
4.8. Subcontratas	175
4.9. Accidentes de trabajo	175
5. Condiciones técnicas.....	176
5.1. Disposiciones de carácter particular.....	176
5.2. Materiales de construcción.....	176
5.3. Materiales para la fabricación de equipos	176
5.4. Equipos y maquinarias	181
5.5. Condiciones de ejecución.....	181

1. Condiciones generales

1.1. Objetivo del Pliego de Condiciones

El siguiente Pliego de Condiciones tiene como objetivo establecer las condiciones administrativas, económicas, legales y técnicas que se deben cumplir de forma obligatoria en el proyecto: “Producción de aceite rico en ácidos grasos omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales”, de forma que el trabajo pueda materializarse con las condiciones especificadas, evitando posibles errores e interpretaciones que no coincidan con las deseadas.

El documento no ha de contradecirse en leyes ni normas, sino que debe complementarlas; además, debe ser preciso y coherente, ya que, cualquier duda podría generar conflictos a la hora de materializar el Proyecto.

El contratista está obligado a ejecutar el proyecto tal y como se detalla en el Pliego de Condiciones, la alteración de alguna de las partes, así como hacer uso de los datos y planos para fines diferentes a este Proyecto, no le está permitido al contratista. A su vez, gracias a este documento la administración podrá conocer detalladamente las tareas que se han de desarrollar durante la ejecución del Proyecto.

1.2. Normativa general

La normativa por la que se rige este proyecto debe estar vigente en el momento de la firma del Contrato de adjudicación y está formada por toda la Legislación de Obligado Cumplimiento. En caso de contradicciones, la Dirección Facultativa será quien determine la forma de actuar y lo dejará por escrito en el Libro de Órdenes; si no se encuentra constancia en el Libro de Órdenes la responsabilidad recaerá en el contratista.

Se utilizará, entre otras, la siguiente normativa general:

- Real Decreto 2060/2008, de 12 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de equipos a presión y sus instrucciones técnicas complementarias.
- Real Decreto 656/2017, de 23 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10.

- Decreto Legislativo 1/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de prevención y control integrados de la contaminación.
- Real Decreto 815/2013, de 18 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación.
- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.
- Real Decreto 634/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba el Reglamento del Impuesto sobre Sociedades.
- Ley 27/2014, de 27 de noviembre, del Impuesto de Sociedades.
- Real Decreto 681/2003, de 12 de junio, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores expuestos a los riesgos derivados de atmósferas explosivas en el lugar de trabajo.

1.3. Documentos del Proyecto

El presente Trabajo de Fin de Grado está formado por los siguientes documentos, expuestos según el orden de lectura:

- Memoria: incluye el objetivo del Proyecto, los datos necesarios para su resolución y la solución como tal.
- Anexos: incluyen las explicaciones y los cálculos necesarios para justificar el resultado del TFG.
- Planos: conjunto de representaciones gráficas necesarias para el eficaz desarrollo del proyecto, deben estar suficientemente detalladas en las tres dimensiones.
- Presupuesto: coste que supone la materialización del Proyecto.

- Pliego de condiciones: incluye las condiciones administrativas, económicas, legales y técnicas requeridas para la ejecución del Proyecto.

De esos documentos, los Planos, el Pliego de Condiciones y el Presupuesto son documentos contractuales, es decir, son de debido cumplimiento; mientras que la Memoria y los Anexos son documentos de carácter informativo. Sólo se pueden modificar con la debida autorización.

Lo descrito en este Pliego de Condiciones primará siempre frente a las contraindicaciones que puedan existir en el resto de documentos. Las omisiones en Planos y Pliego de Condiciones que sean indispensables para el cumplimiento del contrato, no exime al contratista de la obligación de su realización.

2. Condiciones de índole facultativa

2.1. Disposiciones generales

A la hora de ejecutar el Proyecto, se establecen las siguientes disposiciones generales:

- Ley, Reglamento y Pliego de Condiciones del estado
- Reglamento de contratación de competencias locales.
- Ley de contrato de trabajo y de disposiciones vigentes que regulan las relaciones patrón-obrero.
- Pliego de Cláusulas económico-administrativas particulares.
- Ordenanza laboral de seguridad e higiene en el trabajo, así como cualquier otra ordenanza con carácter general que se dicte.

2.2. Términos del Pliego de Condiciones

Para una mejor comprensión del Pliego de Condiciones, se explica el significado de los términos principales del documento:

- Propiedad: los derechos del Proyecto corresponden a la entidad pública o la empresa que quiera ejecutarlo.
- Dirección de obra: representa a la Propiedad, defiende sus intereses y establece las relaciones contractuales con el Contratista adjudicatario del Proyecto. Es responsable de que la obra sea una reproducción fehaciente de lo proyectado y expuesto en este Pliego, así como de la revisión de materiales, del estado de los equipos, del perfecto funcionamiento y del refuerzo técnico al contratista (si fuese necesario). Está formada por un profesional con título habilitante que designa la Propiedad en su momento.
- Contratista: persona o entidad fiscal que lleva a cabo la realización material del Proyecto o, al menos, una parte de él por contrata con la Propiedad. Cuando en el Pliego se hace referencia al contratista, solo se refiere a este, no a las subcontratas que pueda realizar.

2.3. Dirección facultativa

Se encarga de la dirección, del control y la vigilancia de las obras de ejecución del Proyecto y recaerá sobre el ingeniero técnico o superior nombrado por la Propiedad. La Dirección Técnica puede modificar parte del Proyecto antes de llevar a cabo la materialización del mismo, si no altera las líneas generales de este, y está debidamente justificado.

El ingeniero director de obra tiene los siguientes desempeños:

- Debe garantizar la ejecución de las obras con total fidelidad al Proyecto o a las modificaciones debidamente aprobadas.
- Debe definir las condiciones técnicas que el Pliego de Condiciones deje a su elección.
- Debe decidir las condiciones técnicas que afloren a la hora de interpretar los Planos, las condiciones de los materiales y la ejecución de unidades de obra, siempre que se cumplan las condiciones del contrato.
- Debe estudiar los contratiempos surgidos en la obra que impiden el normal cumplimiento del contrato o aconsejen su rectificación, llevando a cabo en caso necesario, las propuestas necesarias.
- Debe obtener las licencias y permisos necesarios de los organismos oficiales y de los particulares, para la ejecución de las obras y la ocupación de los bienes damnificados por ellas; y solucionar los problemas provocados por los servicios relacionados con la misma.
- Debe asumir la dirección de determinadas operaciones o trabajos en caso de emergencia, y el contratista deberá poner a su disposición y servidumbre todo lo necesario relacionado con las mismas.
- Debe justificar al contratista las obras llevadas a cabo, de acuerdo a lo dispuesto en los documentos del contrato.

- Debe participar en la recepciones provisionales y definitivas, además de redactar la liquidación de las obras conforme a las normas legales.

2.4. Obligaciones y derechos del contratista

El contratista es la parte contratada que ejecuta el Proyecto por el precio definido, cumpliendo el contrato y siguiendo el Libro de Órdenes. Cualquier alteración del personal cualificado que desee realizar deberá comunicárselo con anterioridad a la dirección facultativa.

El contratista o alguno de sus representantes deberá estar en la obra durante la jornada legal de trabajo y acompañará a la dirección facultativa en las inspecciones que haga a la obra. Debe conocer las cláusulas laborales que puedan ser aplicadas durante la ejecución del proyecto y debe cumplirlas. Además, aportará el número de operarios, personal supervisor y administrativo necesario para que el programa de ejecución se cumpla.

El contratista recibirá, libre de todo gasto, tres copias de los planos para la realización del Proyecto, en caso de requerir más copias, se les hará entrega una vez las haya pagado. El contratista también deberá asumir los siguientes gastos:

- Gastos de montaje, conservación y retirada de las instalaciones para el abastecimiento de agua y energía eléctrica necesaria.
- Gastos de construcción y retirada de toda clase de construcciones auxiliares.
- Gastos de demolición y desmontaje de las instalaciones provisionales.
- Gastos de alquiler o adquisición de terrenos para el depósito de materiales y maquinaria.
- Gastos de limpieza y retirada de desperdicios de basura.
- Gastos de suministro, conservación y colocación de señales de tráfico, baliza y demás recursos necesarios para garantizar la seguridad dentro del recinto de la obra.

- Gastos de retirada de materiales rechazados y corrección de carencias detectadas y puestas de manifiesto en los ensayos y pruebas.
- Gastos de protección de acopio de la propia obra contra el deterioro, daño o incendio, cumpliendo con los requisitos vigentes para proporcionar la seguridad necesaria dentro de las inmediaciones de la obra.

El desarrollo de la obra es responsabilidad exclusiva del contratista, no podrá involucrar a terceros, ni aún en el caso de subcontratar ciertas partes de la obra.

2.5. Obra y ejecución

2.5.1. Facultades de la dirección de obra

La dirección de la obra es la única autorizada para interpretar el Proyecto y presentar órdenes complementarias que faciliten la realización del mismo. La persona encargada de la dirección de obra debe ser titulada académica y profesional habilitante de arquitecto, arquitecto técnico, ingeniero o ingeniero técnico.

Puede ordenar modificaciones de detalle antes del comienzo de la ejecución del Proyecto, siempre y cuando su introducción sea ventajosa, no alteren las premisas generales y no se exceda su garantía técnica.

Toda modificación presupuestaria o técnica derivada de las anteriores debe ser aceptada por el contratista. En cambio, las modificaciones propuestas por el contratista, antes de ser aceptadas o rechazadas, deben ser estudiadas por la dirección de obra, y el contratista deberá aceptar la resolución.

Las reclamaciones que el contratista quiera hacer contra las órdenes de la dirección facultativa, las presentará a través de la misma o ante la Propiedad, si son de carácter económico, y si son de carácter técnico o facultativo no se admitirá ninguna reclamación.

2.5.2. Libro de Órdenes

En el Libro de Órdenes y Asistencias quedarán registradas todas las visitas que realizará la dirección de obra, los contratiempos y cualquier dato que sirva para comprobar que el contratista ha cumplido con los plazos y las fases establecidas para la ejecución del Proyecto. Se dicta por la Orden Ministerial de 9 de junio de 1971 que establece los requisitos del mismo disponiendo su presentación al finalizar las obras, junto con el certificado final de obra.

Lo que queda recogido en el libro será definitivo a la hora de resolver una posible incidencia.

2.5.3. Inicio del trabajo

El inicio de cualquier fase de la ejecución del Proyecto debe ser notificada por escrito al ingeniero director. El encargado de la notificación será el contratista, y deberá realizarla 24 horas antes del comienzo de la fase.

El contratista adjudicatario debe iniciar la obra en un plazo de 15 días a partir de la adjudicación. El ingeniero jefe debe facilitar cuentas para la fecha de inicio, y para los recibos.

El plazo de ejecución de la obra se ajustará a la planificación realizada por el cliente y coordinada por el contratista. El cliente debe informar con mínimo 3 días de antelación de la accesibilidad a las instalaciones para el inicio de la obra.

2.5.4. Replanteo

Proceso en el que se marca convenientemente la superficie de la obra con los puntos de referencia necesarios para la ejecución del Proyecto. Se redacta un acta por triplicado o se registra en el Libro de Órdenes, debiendo ser aprobado por la dirección de obra y la contrata.

Si es necesaria alguna modificación se comunicará a la Propiedad y redactará un proyecto reformado. La Propiedad debe tomar una decisión y comunicársela al contratista.

El contratista es el encargado de facilitar los medios necesarios para llevar a cabo el replanteo y asumirá la responsabilidad de la conservación de la señales o referencias que se mantengan en el terreno con motivo del replanteo.

2.5.5. Ejecución de la obra

El contratista comenzará la obra a la semana de la firma del contrato, a no ser que en el mismo haya fijada otra fecha. La fecha de comienzo fijada contará a efectos de plazo de ejecución y de revisión de plazos en el supuesto de haberse pactado previamente.

El plazo para finalizar la obra quedará fijado en el contrato y su incumplimiento por parte del contratista puede conllevar una rescisión unilateral del contrato.

El contratista presentará un calendario en el que se precisa la duración total de la obra, la duración de cada una de las partes que la componen y una oferta económica.

2.5.6. Maquinaria

El contratista está obligado a proporcionar la maquinaria a la que se haya comprometido a aportar, así como la que la dirección de obra considere necesaria para la correcta ejecución del proyecto.

Los equipos deben ajustarse a las condiciones fijadas en sus hojas de especificaciones. Toda la maquinaria debe estar en las condiciones idóneas para su uso y quedar vinculada a la obra durante el tramo de ejecución de la fase en la que se deba utilizar. Para poder retirar la maquinaria de la obra, se deberá contar con el permiso del director de obra.

2.5.7. Materiales

Todos los materiales necesarios en la obra serán proporcionados por el contratista, a no ser que en los Planos o en el Pliego de Condiciones se exprese lo contrario. La dirección de obra podrá rechazar materiales que no ofrezcan la calidad que considere adecuada.

Todos los materiales se deben manipular manteniendo su calidad. Por causa justificada, el ingeniero puede inspeccionar el material o los productos manufacturados adquiridos;

además, el contratista deberá notificarla llegada de los materiales 2 semanas antes para agilizar las tareas de inspección y prueba de los materiales por parte del ingeniero.

Todos los materiales que no cumplan los requisitos establecidos en el Pliego de Condiciones se considerarán inadecuados y, por tanto, no se hará uso de ellos salvo que el ingeniero jefe autorice su uso mediante alguna indicación. Si se corrigen los defectos de algún material rechazado, no podrán utilizarse hasta obtener la autorización del ingeniero.

2.5.8. Pruebas de control de calidad y ensayos

Para comprobar que los materiales y las unidades cumplen con los requisitos del Pliego de Condiciones, la dirección de obra ordenará la realización de todas las pruebas de control de calidad y ensayos que crea necesarias.

La dirección de obra establecerá los materiales que deben ser ensayados, el tipo y las normas del ensayo, la localización y el número de ensayos. Además, deberá supervisar cada prueba.

El contratista adoptará las medidas necesarias para distinguir los materiales aceptados de los rechazados durante los ensayos de recepción. También se encargará de retirar de manera inmediata los materiales descartados y reponerlos por otros adecuados, sin afectar al desarrollo normal de la obra. Estos ensayos no hacen libre al contratista de subsanar, reponer o reparar los equipos e instalaciones rechazadas.

2.5.9. Puesta a punto y pruebas de funcionamiento

Antes de comprobar la recepción provisional, la obra se someterá a pruebas de funcionamiento, básicamente de resistencia, estabilidad e impermeabilidad. El contratista llevará a cabo la puesta a punto de la instalación, confirmándose pruebas generales de su funcionamiento y efectividad de tratamiento.

Se realizarán pruebas de funcionamiento a pleno caudal a los componentes de la instalación que, por sus condiciones, así lo requieran. Se comprobará el correcto funcionamiento en la totalidad de las instalaciones y mecanismos de la instalación.

2.5.10. Almacenamiento de materiales

El contratista se encargará de la seguridad de los almacenes y los materiales. Debe asegurar un almacenamiento correcto de los materiales que se encuentren a pie de obra, además debe reponer los que hayan perdido calidad durante su almacenaje, ya sea debido a fenómenos meteorológicos (corrimientos de tierras, inundaciones...) o a daños producidos por animales, plantas, vehículos o tráfico.

La dirección de obra podrá pedir la realización de ensayos periódicos a materiales especialmente propensos a ser dañados durante su almacenamiento, especialmente a poco tiempo de comenzar a utilizarlos. El hecho de haber realizado los ensayos de recepción, no eximen al contratista de su obligación de reponer parcial o totalmente aquellos materiales que puedan haberse estropeado durante su estancia en el almacén.

2.5.11. Partidas de alzada

Una partida de alzada es una unidad de obra cuyo precio se fija en una cifra arbitraria, siendo esta el resultado de una evaluación ordenada y rigurosa, en función de la valoración llevada a cabo.

Para su materialización se debe obtener el visto bueno de la dirección de obra. Entonces, antes de proceder a la ejecución, se analizará detalladamente el importe de las mismas y si la dirección de obra estuviese conforme podrían llevarse a cabo.

2.5.12. Recepción provisional de las obras

Una vez completado el periodo de la prueba de funcionamiento con resultados favorables y haber cumplido todas las obligaciones estipuladas en el contrato, se procede a la recepción provisional según la legislación vigente.

Se debe dejar constancia del acto de recepción, se levantará acta, y estarán presentes la persona en quien delegue la entidad promotora de las obras, la dirección de obra y el contratista.

2.5.13. Periodo de garantías

El contratista debe garantizar todas las obras que ejecuta, así como los materiales que emplea en ellas y su correcta manipulación. El plazo de garantía será de 12 meses, a no

ser que en el Proyecto se especifique otro, durante ese tiempo el contratista corregirá los defectos encontrados y volverá a llevar a cabo las obras rechazadas, sin derecho a indemnización.

Junto a la recepción final de los equipos se hará entrega de una lista de repuestos, sus precios y proveedores recomendados. El contratista podrá contratar un programa de mantenimiento preventivo o de asistencia en caso de avería o desperfecto, que cubra el periodo de garantía y un tiempo posterior, de acuerdo con la Propiedad.

2.5.14. Condición final de la obra

El contratista deberá entregar a la dirección de obra tres ejemplares de un documento final de obra, antes de la recepción definitiva, donde se habrán recogido todas las incidencias que ocurridas en el transcurso de la obra, así como las modificaciones que se llevaron a cabo.

2.5.15. Recepción definitiva de las obras

A partir del mes siguiente al vencimiento de la garantía, se procede a la recepción final de la obra y si se encuentra en las condiciones esperadas, se lleva a cabo su recepción definitiva, de la que se levanta acta y en la que el contratista quedará eximido de toda responsabilidad.

3. Condiciones económicas

3.1. Condiciones generales

El presupuesto del Proyecto se elabora en cuanto a las dimensiones de cada una de las unidades: superficie, volumen, peso y longitud; en el precio de cada unidad están incluidos todos los materiales, accesorios y operaciones requeridas para ejecutar el trabajo de forma que pueda entregarse.

Si existe alguna modificación de dichas dimensiones por parte del contratista, este se hará cargo del aumento del precio, al igual que del costo de las obras auxiliares necesarias, las construcciones que deban ser rehechas y las herramientas requeridas para la ejecución de la obra.

Los honorarios, los impuestos y demás tasas originadas en inspecciones o derivados de la aprobación y comprobación de las instalaciones también correrán a cargo del contratista y no podrá pedir una indemnización por dichas causas.

Las personas que intervienen en el proceso de ejecución del Proyecto tienen derecho a recibir la cantidad de dinero preestablecido en su contrato por su trabajo. Tanto el contratista como la Propiedad y, en algunos casos, los técnicos, pueden exigirse entre ellos el cumplimiento de sus compromisos de pago.

3.2. Fianzas

El contratista proporcionará fianza con arreglo a algunos de los siguientes procedimientos, según se encuentre pactado:

- Previo depósito, en metálico, valores o aval bancario, con una valía entre el 5% y el 10% del precio total de la contrata.
- Mediante la retención en las certificaciones parciales o pagos a cuenta en igual proporción.

Ejecución de trabajos con cargo a la fianza

Si el contratista no finalizara por cuenta propia los trabajos de la obra en las circunstancias firmadas, el director de obra, en representación del propietario, ordenará su ejecución a un tercero, o bien, lo realizará directamente por administración, abonando el coste con la fianza.

Devolución de la fianza

Si la fianza depositada se devuelve íntegramente, tiene que realizarse en un plazo máximo de 30 días una vez firmada el Acta de Recepción definitiva de la obra. La Propiedad podrá exigirle al contratista que le justifique el desembolso y finiquito de sus deudas provocadas por la ejecución de la obra.

En determinadas ocasiones, la Propiedad accede a realizar recepciones parciales, siempre y cuando el director de obra esté conforme. En estos casos, el contratista tiene derecho a que se le devuelva su parte proporcional de la fianza.

3.3. Precios

Composición de precios unitarios

Todos los precios unitarios se presuponen valorados para cada partida totalmente finalizada y, en el caso de maquinaria y equipos en funcionamiento están incluidos la puesta a punto, suministros de pruebas, permisos, licencias, impuestos, etc. Así para calcular el precio de cada una de las unidades de obra se suman los costes directos, los indirectos, los gastos generales, el beneficio industrial y el precio por contrata.

A continuación, con el fin de mejorar la compresión se expondrán brevemente:

- Los costes directos incluyen:
 - La mano de obra que intervenga directamente en la ejecución de la obra, con sus cargas, aumentos y correspondientes seguros sociales.
 - Los materiales que queden integrados en alguna de las unidades o que sean necesarios para su ejecución.

- Los equipos y sistemas técnicos de seguridad e higiene para la prevención y protección de accidentes y enfermedades de ámbito profesional.
- Los gastos de amortización y conservación de la maquinaria, instalaciones, sistemas y equipos citados anteriormente.
- Gastos en personal, combustible, energía, etc., que se produzcan debido al uso de la maquinaria e instalaciones utilizadas en la ejecución de la obra.
- Costes indirectos, estos se obtienen a partir de los costes directos, incluyen:
 - Los gastos de instalación de oficinas portátiles a pie de obra, comunicaciones, edificación de almacenes, talleres, laboratorios, pabellones para el personal, y seguros de estas instalaciones.
 - Costes en personal técnico administrativo que está adscrito solamente a la obra y son imprevistos.
- Gastos generales legalmente establecidos (e.g. gastos financieros, cargas fiscales o tasas de administración). Se establecen como un porcentaje de la suma total de los costes descritos anteriormente (en los contratos de obras públicas son entre el 13 y el 17%).
- Beneficio industrial del contratista, que se establece en un 6% sobre la suma de las anteriores partes.

El precio de ejecución material se define como la suma de los conceptos anteriores excepto el beneficio industrial; mientras que el precio de contrata es el coste total de la unidad de obra y corresponde con la suma de los costes directos, indirectos, los gastos generales y el beneficio industrial. El IVA se establece sobre este último, pero no se integra en el precio.

Precios contradictorios

Se producirán precios contradictorios en el momento en el que la Propiedad introduzca unidades, cambios de calidad en alguna de las fases de la ejecución de la obra o sea necesario solucionar algún contratiempo. El contratista estará obligado a efectuar los cambios.

Si no hubiera acuerdo en el precio, el importe se resolvería entre el contratista y la dirección de obra antes de comenzar la ejecución de la obra teniendo en cuenta la descomposición de precios del catálogo correspondiente y teniendo que ser aprobado por la Propiedad. Las unidades con precios contradictorios se incluirán al final de las partidas totales.

Reclamaciones de aumento de precios por causas diversas

Si antes de firmar el contrato, el contratista no ha realizado ninguna reclamación u observación, no podrá reclamar, por error u omisión, un aumento de los precios establecidos en el Presupuesto para ejecutar la obra.

Revisión de precios contratados

Si aumentasen los precios en un porcentaje igual o superior al 3% del importe presupuestado en el contrato, estos se revisarían conforme a los últimos índices oficiales de recisión de precios que se hubieran aprobado por la comisión delegada de asuntos económicos y hayan sido publicados en el Boletín Oficial del Estado (BOE). No habrá revisión de precios en las unidades que puedan quedar fuera de los plazos establecidos.

En la actualidad, las fórmulas polinómicas con estructuras de costos permitidas y, por consiguiente, utilizadas en las recisiones de contratos, son las derivadas del Decreto Ley 2/1964 de 4 de Febrero, por el que se modifica el 16/1963, de 10 de Octubre, sobre inclusión de cláusulas de revisión en los contratos de grados y Organismos Autonómicos (BOE 6/2/64).

Las fórmulas actualmente aplicables son las siguientes:

- De la 1 a la 39 del Decreto 3650/1970 de 19 de Diciembre (BOE 29/12/70)
- De la 40 a la 48 del Real Decreto 2167/1981 de 20 de Agosto (BOE de 24/9/81)

Mejoras y modificaciones

Cualquier alteración en las unidades que provoquen la fabricación de un número distinto de las mismas, en más o menos de las estipuladas en el estado de mediciones y presupuesto, deberá ser conocida y aprobada previamente a su realización por la dirección de obra, adjuntándose al Libro de Órdenes la autorización y la verificación de su ejecución.

3.4. Valoración, medición y abono de los trabajos

Método de abono de las obras

Según el método de contratación de las obras y salvo que en el Pliego de Condiciones económicas se regularice de otra manera, el abono de los trabajos se realizará de la siguiente forma:

- Tipo fijo o tanto alzado del total: se abonará el valor anteriormente establecido como base de la concesión, disminuido en su caso en la valía de baja formalizada por el adjudicatario.
- Tipo fijo o tanto alzado por unidad de obra: su importe no variable se fija con anterioridad, pudiéndose variar tan solo el número de unidad ejecutadas. Se abonará al contratista el importe por valor de las trabajos ejecutados y ultimados con arreglo y sujeción a los documentos que forman el presente TFG.
- Por unidad de obra: según el escenario en el que se lleve a cabo y los materiales tolerados en la forma que el presente Pliego de Condiciones económicas determine. Se abonará al contratista en los mismos términos que en el en caso anterior.
- Por listas de jornales y recepción de materiales acreditados en la forma que el presente Pliego de Condiciones económicas determine.
- Por horas trabajadas, los acuerdos se reflejan en el contrato.

Relaciones valoradas y certificaciones

El contratista establecerá una relación valorada de las obras ejecutadas en cada una de las fechas fijadas en el contrato o en el Pliego de Condiciones, según las mediciones que habrá estimado el aparejador.

Lo que aplica el contratista según las condiciones establecidas, se valorará aplicando al resultado el cálculo general, cúbico, superficial, lineal, ponderal o numérico para cada unidad de la obra; los precios indicados para cada una de ellas, establecidos en el Pliego de Condiciones económicas, respecto a las mejoras o sustitución de material y obras auxiliares.

Los resultados de la relación valorada serán entregados al contratista por el director de la obra y tendrá un plazo de 10 días para examinar y declarar su conformidad o, en cambio, realizar las revisiones que considere oportunas. El director de obra, tendrá otro plazo de 10 días para aceptar o rechazar las reclamaciones propuestas por el contratista, en caso de que existieran.

Las certificaciones se facturarán al propietario, en el mes siguiente al periodo referido y tendrán validez de documento y entregas a cuenta.

3.5. Indemnizaciones

Retraso en las obras sin justificación

Si el plazo de las obras hubiera finalizado y su ejecución no se hubiera completado sin motivos justificados por parte del contratista, se le aplicarán las siguientes penalizaciones desde la fecha estipulada de finalización de la obra:

- 0,1% por cada uno de los días naturales de retraso hasta el día 30.
- 0,5% del valor al que ascienda la fianza a partir del día 31 hasta el 60.

Transcurridos 60 días, el contrato se rescindirá quedando el contratista obligado a responder por daños y perjuicios a la entidad.

Retraso en los pagos

Si el propietario no ejerciera el pago de las obras ejecutadas a los operarios dentro del mes siguiente al plazo acordado, el contratista tendrá derecho a recibir un 4,5% de la cuantía anual, en concepto de intereses por retraso.

Si transcurren 2 meses más a partir del mes citado en el párrafo anterior, el contratista tendrá derecho a la resolución del contrato, llevando a cabo la liquidación correspondiente de las obras ejecutadas y de los materiales almacenados, siempre que cumplan las condiciones preestablecidas y no excedan los necesarios para finalizar la obra.

Se rechazarán todas las solicitudes de resolución de contrato basadas en retrasos en los pagos cuando el contratista no sea capaz de justificar, en la fecha de solicitud, el porcentaje del Presupuesto, fijado por contrato, que ha invertido en obras o materiales.

3.6. Seguros y conservación de la obra

El contratista actuará siempre velando por los intereses de la Propiedad, durante el periodo de construcción y de pruebas contratará los siguientes seguros:

- De accidente de trabajo y demás seguros sociales del personal contratado, según la legislación vigente.
- De daños que puedan sufrir las obras durante el periodo de construcción y de pruebas, incluyéndose la cobertura de riesgos catastróficos.
- Seguro obligatorio de vehículos a motor, propio o contratados que intervengan en los trabajos de construcción a todo riesgo, con garantía de responsabilidad civil limitada.

4. Condiciones legales

4.1. Disposiciones legales

La legislación que ha de seguirse para la ejecución del proyecto es la siguiente:

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales.
- Ordenanza General de Seguridad e Higiene en el Trabajo y Plan Nacional de Higiene y Seguridad del Trabajo (O.M 9 de marzo de 1971).
- Decreto Legislativo 1/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de prevención y control integrados de la contaminación.
- Real Decreto 656/2017, de 23 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de Almacenamiento de Productos Químicos y sus Instrucciones Técnicas Complementarias MIE APQ 0 a 10.
- Real Decreto 2060/2008, de 12 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de equipos a presión y sus instrucciones técnicas complementarias.
- Real Decreto 815/2013, de 18 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación.
- Real Decreto 681/2003, de 12 de junio, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores expuestos a los riesgos derivados de atmósferas explosivas en el lugar de trabajo.
- Real Decreto 1777/2004, de 30 de julio, por el que se aprueba el Reglamento del Impuesto sobre Sociedades.
- Ley 27/2014, de 27 de noviembre, del Impuesto de Sociedades.

En el caso de llevar a cabo el presente Proyecto, se deberá aplicar la normativa vigente en ese momento con independencia de la especificada en cualquiera de los documentos.

4.2. Contratista

Obligaciones del contratista

Está obligado a llevar a cabo de forma minuciosa todas las obras que se le encomiendan, así como a cumplir rigurosamente todas las condiciones establecidas en el Pliego de Condiciones o en el contrato, además de las órdenes que recibe verbalmente o por escrito del director de la obra.

Responsabilidades del contratista

El contratista será el único responsable de la calidad final de la obra y no tendrá derecho a indemnización si el coste total de la obra excede el acordado, ni por los fallos cometidos durante la ejecución de la misma.

El contratista debe proporcionar a dirección de obra todas las facilidades para llevar a cabo el replanteo, el reconocimiento, las mediciones, prueba de materiales e inspecciones visuales de la ejecución de todas las unidades de obra, con objeto de comprobar el cumplimiento de lo exigido en el contrato.

También es el responsable de llevar a cabo el pago de los salarios a los trabajadores, de los materiales necesarios para la ejecución, así como del pago de los impuestos, tasas, derechos, contribuciones y cargas sociales que establezcan la legislación del país donde se lleve a cabo la obra, que se deben conocer y cumplir.

Además, el contratista tiene la obligación de cumplir con las medidas de seguridad vigentes, para evitar cualquier accidente posible de obreros o viandantes, en los lugares donde estos puedan tener lugar, a fin de garantizar salud y seguridad en el trabajo. Por tanto, será responsable ante los tribunales por los accidentes que la inexperiencia o descuido puedan provocar durante la ejecución de la obra, debiendo ceñirse en todo momento a las normas de prudencia, así como a las disposiciones y reglamentos.

4.3. Leyes laborales

Según la normativa vigente, o las legislaciones que se puedan dictar durante el transcurso de la obra, todo el personal de la obra tendrá que estar asegurado por el contratista, y debe poder demostrarse si la dirección técnica lo viera oportuno.

4.4. Mano de obra

La mano de obra será contratada por el contratista y debe ser proporcional a la extensión de la obra, así como estar cualificada para realizar los trabajos correspondientes. Los operarios estarán vigilados por un técnico en todo momento, con el fin de asegurar el debido cumplimiento del Pliego de Condiciones y las correctas interpretaciones de los Planos.

4.5. Daños en propiedades vecinas

Si se dañara alguna propiedad que no corresponde con la obra, el contratista se hará cargo de los desperfectos ocasionados. Así mismo, el contratista adoptará todas las medidas necesarias para no ocasionar daños de esta índole.

4.6. Rescisión del contrato

La posible rescisión del contrato se emitirá por el Real Decreto 1098/2001, de 12 de Octubre, por el que se aprueba el Reglamento general de la Ley de Contratos de las Administraciones Públicas, concretamente por el Pliego de Cláusulas Administrativas Generales y demás disposiciones vigentes.

El contrato solo podrá rescindirse en ciertas ocasiones, y en caso de darse, el promotor deberá comunicar al contratista su deseo de revocar el contrato y tratar de llegar a un acuerdo entre ambas partes. Si el acuerdo es positivo, el contratista tendrá derecho a una indemnización que cubra los gastos producidos hasta el momento; si no se llega a un acuerdo, los abogados de las partes deberán llegar a este. A continuación, se especifican algunas de las causas que podrían conllevar una rescisión de contrato:

- Fallecimiento o incapacidad del contratista.
- Quiebra o incapacidad económica del contratista.
- Alteración del contrato por las siguientes causas:
 - Modificaciones del Proyecto fundamentales a juicio del director de obra, respetando como mínimo el 25% el presupuesto.

- Variaciones de aproximadamente un 40% en las unidades de obra.
- Abandono de la obra sin causa justificada.
- Suspensión de la obra una vez comenzada.
- Incumplimiento de las condiciones del contrato en el cual se produzcan descuidos o perjuicios.

4.7. Adjudicación

Las ofertas se presentan en una subasta cerrada y son evaluadas sobre la base de las condiciones legales, técnicas, económicas y financieras establecidas en las mismas. Se adjudican según los siguientes aspectos principalmente:

- Documentación técnica.
- Condiciones económica-financieras.
- Precio final.
- Tiempo de ejecución de la obra.

4.8. Subcontratas

Para subcontratar a terceros para la ejecución de la obra o parte de ella, el contratista debe tener la aprobación por escrito de la Propiedad, aunque esta no lo exime de sus responsabilidades ni de sus obligaciones derivadas del contrato.

4.9. Accidentes de trabajo

El contratista debe cumplir con las disposiciones de la Ley 31/1995 (8 de noviembre) de Prevención de Riesgos Laborales, considerando su última modificación del 29 de diciembre de 2014, así como las normas de seguridad de la Propiedad, ya sean generales o particulares, con el objetivo de prevenir posibles accidentes laborales.

5. Condiciones técnicas

Las condiciones técnicas son aquellas que recogen una caracterización de los materiales, equipos y obras que van a operar durante la materialización del Proyecto. Además, se describen en ellas las responsabilidades técnicas que recaen en el contratista y el director técnico.

5.1. Disposiciones de carácter particular

Las disposiciones de ámbito técnico y carácter particular son:

- Normativa de la Asociación Española de Normalización (AENOR).
- Normas de tecnología de la Edificación:
 - Instalaciones de fontanería: Abastecimiento (IFA).
 - Instalaciones de salubridad: Alcantarillado (ISA).
 - Instalaciones eléctricas: Puesta en tierra (JET).

5.2. Materiales de construcción

Todos los materiales empleados durante la obra, deben cumplir las regulaciones del Catálogo de Normas UNE de 1992. Estos materiales serán testeados por parte de la contrata para verificar su calidad.

5.3. Materiales para la fabricación de equipos

Para la ejecución de la planta, el sistema de tuberías, accesorios, válvulas y demás dispositivos, exceptuando el biorreactor y el extractor de aceite, serán adquiridos en empresas autorizadas cuya fabricación cumple las regulaciones especificadas. Las normativas son las siguientes:

- UNE-EN 13311-4:2001: Biotecnología. Criterios de funcionamiento de los recipientes. Parte 4: Biorreactores.

- UNE-EN 1401-1:2009: Sistemas de canalización en materiales plásticos para saneamiento enterrado sin presión. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 1: Especificaciones para tubos, accesorios y el sistema.
- UNE-EN 13598-1:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para saneamiento y evacuación enterrados sin presión. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Parte 1: Especificaciones para los accesorios auxiliares incluyendo las arquetas de inspección poco profundas.
- UNE-EN 13598-2:2017: Sistemas de canalización en materiales plásticos para saneamiento y evacuación enterrados sin presión. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Parte 2: Especificaciones para los pozos de registro y arquetas de inspección.
- UNE 53331:1997 IN: Plásticos. Tuberías de poli (cloruro de vinilo) (PVC) no plastificado y polietileno (PE) de alta y media densidad. Criterio para la comprobación de los tubos a utilizar en conducciones con y sin presión sometidos a cargas externas.
- UNE-EN ISO 1452-2:2010: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 2: Tubos. (ISO 1452- 2:2009).
- UNE-EN 13476-1:2018: Sistemas de canalización en materiales plásticos para evacuación y saneamiento enterrado sin presión. Sistemas de canalización de pared estructurada de poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U), polipropileno (PP) y polietileno (PE). Parte 1: Requisitos generales y características de funcionamiento.
- UNE-EN ISO 1452-5:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 5: Aptitud al uso del sistema. (ISO 1452-5:2009, versión corregida 2010-03-01).
- UNE-EN ISO 1452-3:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli (cloruro de

vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 3: Accesorios (ISO 1452- 3:2009, versión corregida 2010-03-01).

- UNE-EN ISO 15877-2:2009/A1:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli (cloruro de vinilo) clorado (PVC-C). Parte 2: Tubos. Modificación 1. (ISO 15877-2:2009/AMD 1:2010).

- UNE-EN ISO 15877-2:2009: sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli (cloruro de vinilo) clorado (PVCC). Parte 2: Tubos. (ISO 15877-2:2009).

- UNE-EN ISO 15877-1:2009/A1:2011: Sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli (cloruro de vinilo) clorado (PVC-C). Parte 1: Generalidades. Modificación 1. (ISO 15877-1:2009/AMD 1:2010).

- UNE-EN ISO 15877-1:2009: Sistemas de canalización en materiales plásticos para instalaciones de agua caliente y fría. Poli (cloruro de vinilo) clorado (PVCC). Parte 1: Generalidades. (ISO 15877-1:2009)

- UNE-EN ISO 1452-4:2010: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua y para saneamiento enterrado o aéreo con presión. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 4: Válvulas. (ISO 1452- 4:2009).

- UNE-ENV 1452-6:2002 ERRATUM:2006: Sistemas de canalización en materiales plásticos para conducción de agua. Poli (cloruro de vinilo) no plastificado (PVC-U). Parte 6: Práctica recomendada para la instalación.

- UNE-EN ISO 14001:2004/AC:2009 Sistemas de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso. (ISO 14001:2004/Cor 1:2009).

- UNE-EN ISO 286-2:2011 Especificación geométrica de productos (GPS). Sistema de codificación ISO para las tolerancias en dimensiones lineales. Parte 2: Tablas de las clases de tolerancia normalizadas y de las desviaciones límite para agujeros y ejes. (ISO 286-2:2010).

- UNE-EN ISO 9001:2008/AC:2009 Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos. (ISO 9001:2008/Cor 1:2009).
- UNE-EN ISO/IEC 17021:2006 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión (ISO/IEC 17021:2006).
- UNE-EN ISO/IEC 17021:2011 Evaluación de la conformidad. Requisitos para los organismos que realizan la auditoría y la certificación de sistemas de gestión. (ISO/IEC 17021:2011).
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 ERRATUM:2006 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. (ISO/IEC 17025:2005/Cor. 1:2006).
- UNE-EN 1991-1-1:2003 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-Acciones generales. Pesos específicos, pesos propios, y sobrecargas de uso en edificios.
- UNE-EN 1991-1-1:2003/AC:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-1. Acciones generales. Pesos específicos, pesos propios, y sobrecargas de uso en edificios.
- UNE-EN 1991-1-2:2004 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-2: Acciones generales. Acciones en estructuras expuestas al fuego.
- UNE-EN 1991-1-2:2004/AC:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-2: Acciones generales. Acciones en estructuras expuestas al fuego.
- UNE-EN 1991-1-7:2010 Eurocódigo 1: Acciones en estructuras. Parte 1-7: Acciones generales. Acciones accidentales.
- UNE-EN 1993-1-10:2009 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-10: Tenacidad de fractura y resistencia transversal.

- UNE-EN 1993-1-1:2008 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1- 1: Reglas generales y reglas para edificios.
- UNE-EN 1993-1-1:2008/AC:2010 Eurocódigo 3: Proyecto de estructuras de acero. Parte 1-1: Reglas generales y reglas para edificios.
- UNE-EN 1996-2:2011 Eurocódigo 6: Proyecto de estructuras de fábrica. Parte 2: Consideraciones de Proyecto, selección de materiales y ejecución de la fábrica.
- UNE-ENV 1997-2:2001 Eurocódigo 7: Proyecto geotécnico. Parte 2: Proyecto asistido por ensayos de laboratorio.
- UNE-ENV 1997-3:2002 Eurocódigo 7: Proyecto geotécnico. Parte 3: Proyecto asistido por ensayos de campo.
- UNE-ENV 1998-4:2004 Eurocódigo 8: Disposiciones para el Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 4: Silos, depósitos y tuberías.
- UNE-EN 1998-1:2011 Eurocódigo 8: Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 1: Reglas generales, acciones sísmicas y reglas para edificación
- UNE-EN 1998-5:2011 Eurocódigo 8: Proyecto de estructuras sismorresistentes. Parte 5: Cimentaciones, estructuras de contención y aspectos geotécnicos.
- UNE-EN 20286-2:1996 Sistema ISO de tolerancias y ajustes. Parte 2: Tablas de los grados de tolerancia normalizados y de las desviaciones límite de los agujeros y de los ejes. (ISO 286-2:1988).
- UNE-EN 20898-2:1994 Características mecánicas de los elementos de fijación. Parte 2: tuercas con valores de carga de prueba especificados. Rosca de paso grueso. (ISO 898-2:1992). (Versión oficial EN 20898-2:1993).
- UNE-EN 45011:1998 Requisitos generales para entidades que realizan la certificación de producto. (Guía ISO/CEI 65:1996).

- UNE-EN 970:1997 Examen no destructivo de soldaduras por fusión. Examen visual.
- UNE-ENV 13381-4:2005 Ensayos para determinar la contribución a la resistencia al fuego de los elementos estructurales. Parte 4: Protección aplicada a elementos de acero.

5.4. Equipos y maquinarias

Todos los equipos y la maquinaria que se encuentran en la línea de producción se rigen por las normas UNE de 1997.

5.5. Condiciones de ejecución

Las normas NBE y NTE establecen las condiciones de ejecución, las funcionales de los equipos y materiales industriales, supervisión y fiabilidad de la operación, y valoración, evaluación y conservación de la misma.

Documento V: Presupuesto

Índice

1. Introducción	183
2. Presupuesto de Ejecución Material (PEM)	184
2.1. Coste del biorreactor	184
2.2. Coste del extractor sólido-líquido	187
3. Presupuesto Total de la Planta	187
4. Presupuesto de Ejecución material para Contrata (PEC).....	189
5. Presupuesto de Ejecución General (PEG)	189

1. Introducción

Este documento tiene como objetivo realizar una evaluación económica para la materialización del Proyecto “Producción de aceite rico en ácidos grasos omega-3 a partir de microalgas y sustratos residuales”.

Hay que tener en cuenta el capital, distinguiendo entre inmovilizado y circulante, y los costes directos e indirectos derivados del montaje de la planta. El inmovilizado corresponde con la parte del capital empleada en la adquisición de elementos con carácter permanente en la empresa como, por ejemplo, equipos, inmuebles, instalaciones auxiliares, etc. Por otro lado, el capital circulante se emplea en elementos que se encuentran en constante actividad y no tienen un carácter permanente en la empresa como, por ejemplo, la compra de materias primas o el pago de nóminas.

2. Presupuesto de Ejecución Material (PEM)

El Presupuesto de Ejecución Material (PEM) es el importe del coste de los materiales y de la mano de obra necesarios para la ejecución de una obra. Se calcula como la suma del coste de cada uno de los equipos que interviene en el proceso.

En el presente Proyecto las unidades descritas con precisión han sido el biorreactor para el cultivo de microalgas y el extractor sólido-líquido de aceite rico en DHA, por tanto, será su coste el que se tenga en cuenta para realizar el PEM.

2.1. Coste del biorreactor

El coste del biorreactor se estima mediante el método de Guthiere, considerando que se trata de un recipiente de proceso y que el valor estimado será para 1968 por lo que después será necesario aplicar un factor de corrección en el tiempo.

Primero, se calcula el costo base utilizando el diámetro y la altura en la gráfica de la Figura 33, y después se calcula el coste del recipiente aplicando los factores de ajuste mostrados en la Figura 34.

Es necesario realizar un cambio de unidades para hacer uso de la gráfica, así que los valores en las unidades correctas se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Dimensiones del biorreactor en las unidades correctas.

	m	ft
Diámetro del biorreactor	1,58	5,18
Altura del biorreactor	2,63	8,63

Al tratarse de un recipiente vertical:

$$\text{Costo base} = 3,1 \cdot 1000 = \$ 3100$$

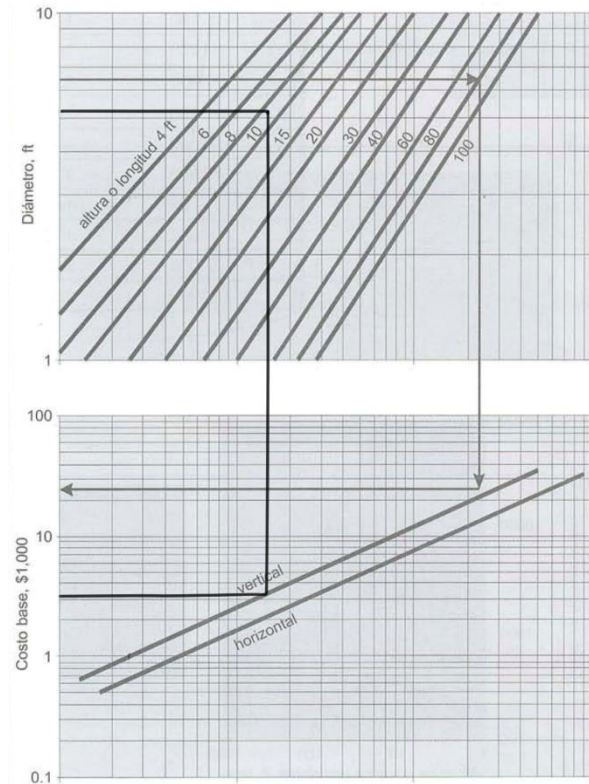


Figura 33. Gráfica para calcular costo base por el método de Guthrie.

RECIPIENTES DE PROCESO

Costo de recipientes de proceso

$$\$ = [\text{costo base} \cdot F_m \cdot F_p]$$

Factores de ajuste

Material de recubrimiento	Fm revestido	Fm sólido
Acero al carbón	1.00	1.00
Inoxidable 316	2.25	3.67
Monel	3.89	6.34
Titanio	4.23	7.89

Factor de presión (Psi)	Fp
Hasta 50	1.00
100	1.05
200	1.15
300	1.20
400	1.35
500	1.45
600	1.60
700	1.80
800	1.90
900	2.30
1000	2.50

Figura 34. Ecuación y factores de corrección para calcular el coste del biorreactor según el método de Guthrie.

Aplicando los factores de ajuste para acero inoxidable 316 como material de recubrimiento y una presión de trabajo de 1 atm (= 14,7 psi):

$$\$ = 3100 \cdot 3,67 \cdot 1 = 11377$$

Ese coste del biorreactor sería para 1968, para obtener el coste a día de hoy (Septiembre de 2021) es necesario aplicar los índices de *Chemical Engineering Plant Cost index* (CEPCI) de los años 1968 y 2021, además de conocer la equivalencia de dólares a euros:

$$\text{Coste en 1968} = \$ 11377 \frac{0,85 \text{ €}}{\$ 1} = 9670,45 \text{ €}$$

$$\frac{\text{Coste 2021}}{\text{Coste 1968}} = \frac{\text{CEPCI 2021}}{\text{CEPCI 1968}} \rightarrow \frac{\text{Coste 2021}}{9670,45} = \frac{668}{113,7}$$

$$\text{Coste 2021} = 56814,96 \text{ €}$$

Sistema de agitación

El coste del sistema de agitación del biorreactor se estima a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Coste}_{\text{agitador}} = a + b \cdot S^n$$

Donde:

- a y b son constante de costes (€)
- S es un parámetro característico (kW)
- n es el índice del equipo

Los valores a, b y n se obtienen de la Tabla 23, mientras que el valor de S es el correspondiente a la potencia de agitación requerida (calculada en el apartado D del Anexo VI). El coste calculado sería para 2010.

Tabla 23. Parámetros característicos para calcular el coste del agitador.

Equipment	Units for Size, S	S_{lower}	S_{upper}	a	b	n	Note
<i>Agitators & mixers</i>							
Propeller	driver power, kW	5.0	75	17,000	1,130	1.05	
Spiral ribbon mixer	driver power, kW	5.0	35	30,800	125	2.0	
Static mixer	liters/s	1.0	50	570	1,170	0.4	

$$Coste_{agitador} = 17000 + 1130 \cdot 2^{1,05} = \$ 19339,70 = 16438,74 \text{ €}$$

$$\frac{Coste \text{ 2021}}{Coste \text{ 2010}} = \frac{CEPCI \text{ 2021}}{CEPCI \text{ 2010}} \rightarrow \frac{Coste \text{ 2021}}{16438,74} = \frac{668}{532,9}$$

$$Coste \text{ 2021} = 20606,27 \text{ €}$$

Towler, G., & Sinnott, R. (2012). *Chemical engineering design: Principles, practice and economics of plant and process design*. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral-proquest-com.bibezproxy.uca.es>

2.2. Coste del extractor sólido-líquido

Para estimar el coste del extractor de aceite se ha consultado directamente con un fabricante (<http://www.refinaciondeaceites.com/planta-de-extraccion-por-solventes/>), teniendo en cuenta la producción anual nos proporcionó una cifra aproximada:

$$Coste_{extractor} = 5000 \text{ €}$$

$$PEM = 56814,96 + 20606,27 + 5000 = 82421,23 \text{ €}$$

El Presupuesto de Ejecución Material del proceso de producción de aceite rico en DHA a partir de microalgas heterótrofas es de “OCHENTA Y DOS MIL CUATROCIENTOS VEINTIÚN EUROS CON VENTITRÉS CÉNTIMOS”.

3. Presupuesto Total de la Planta

Una vez determinado el PEM del equipo diseñado, es preciso estimar el coste total de la planta incluyendo tuberías, instrumentación, electricidad, etc. Para ello se emplea la Tabla 24 considerando que se trabaja con un proceso fluido-sólido.

Tabla 24. Parámetros para estimar el coste total de la planta.

Item	Fluids	Process Type Fluids-Solids	Solids
1. Major equipment, total purchase cost	C_e	C_e	C_e
f_{er} Equipment erection	0.3	0.5	0.6
f_p Piping	0.8	0.6	0.2
f_i Instrumentation and control	0.3	0.3	0.2
f_{el} Electrical	0.2	0.2	0.15
f_c Civil	0.3	0.3	0.2
f_s Structures and buildings	0.2	0.2	0.1
f_l Lagging and paint	0.1	0.1	0.05
ISBL cost $C = \Sigma C_e \times$	3.3	3.2	2.5
Offsites (OS)	0.3	0.4	0.4
Design and Engineering (D&E)	0.3	0.25	0.2
Contingency (X)	0.1	0.1	0.1
Total fixed capital cost $C_{FC} = C(1 + OS)(1 + DE + X)$			
$= C \times$	1.82	1.89	1.82
$= \Sigma C_e \times$	6.00	6.05	4.55

En la Tabla 25 se muestra un desglose del Coste Total de la Planta.

Tabla 25. Desglose del Coste Total de la Planta.

Concepto	Presupuesto (€)
PEM	82421,23
Montaje de equipos	41210,62
Tuberías	49452,74
Instrumentación	24726,37
Electricidad	16484,25
Tanques de almacenamiento	16484,25
Presupuesto de auxiliares	148358,23
Presupuesto total de la planta	230779,46

El Presupuesto Total de la Planta del proceso de producción de aceite rico en DHA a partir de microalgas heterótrofas es de “DOSCIENTOS TREINTA MIL SETECIENTOS SETENTA Y NUEVA EUROS CON CUARENTA Y SEIS CÉNTIMOS”.

Towler, G., & Sinnott, R. (2012). *Chemical engineering design: Principles, practice and economics of plant and process design*. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral-proquest-com.bibezproxy.uca.es>

4. Presupuesto de Ejecución material para Contrata (PEC)

El Presupuesto de Ejecución material para Contrato (PEC) es la cuantía que cobra el contratista, por tanto, equivale a la suma de la parte proporcional de sus Gastos Generales y del Beneficio Industrial a conseguir de la obra.

Los Gastos Generales incluyen gastos de empresa y tasas, cargas fiscales, gastos financieros, etc., y su valor se calcula como el 13-17% del Coste Total de la Planta, mientras el Beneficio Industrial del contratista equivale a un 6%. En este caso se trabajará con un 15% de Gastos Generales.

En la Tabla 26 se muestra un desglose del Presupuesto de Ejecución material para Contrato del Proyecto.

Tabla 26. Desglose del Presupuesto de Ejecución material para Contrato.

Concepto	Presupuesto (€)
Coste Total de la Planta	230779,46
Gastos Generales	34616,92
Beneficio Industrial	13846,77
PEC	279243,15

El Presupuesto de Ejecución material para Contrato del proceso de producción de aceite rico en DHA a partir de microalgas heterótrofas es de “DOSCIENTOS SETENTA Y NUEVE MIL DOSCIENTOS CUARENTA Y TRES EUROS CON QUINCE CÉNTIMOS”.

5. Presupuesto de Ejecución General (PEG)

El Presupuesto de Ejecución General (PEG) consiste en aplicar el Impuesto sobre el Valor Añadido (IVA), cuyo valor en septiembre de 2021 es el 21% del importe, al PEC.

La Tabla 27 muestra el PEG desglosado.

Tabla 27. Presupuesto de Ejecución General.

Concepto	Presupuesto (€)
PEC	279243,15
IVA	58641,06
PEG	337884,21

Finalmente, una vez se contabiliza el IVA, se obtiene la estimación del capital necesario para la ejecución del presente Proyecto, cuyo valor corresponde con “TRESCIENTOS TREINTA Y SIETE MIL OCHOCIENTOS OCHENTA Y CUATRO EUROS CON VEINTIÚN CÉNTIMOS”.

La elevada cifra de la cuantía final se debe al alto precio del sistema de agitación del biorreactor, por lo que otro tipo de estimación del precio o barajar fabricantes alternativos disminuiría el Presupuesto General de Ejecución.